

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

Paix – Travail – Patrie

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE



REPUBLIC OF CAMEROON

Peace – Work – Fatherland

THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY

LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE

LABORATORY OF MICROBIOLOGY

**DYNAMIQUE MICROBIENNE ET QUALITE DE LA FEVE
ASSOCIEES AU BEANS SPREADING LORS DE LA FERMENTATION
DU CACAO (*Theobroma cacao* L.)**

Mémoire rédigé et présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie

Option : Microbiologie Alimentaire et Industrielle

Par :

MVOTO MEYONG Jean Jacques

Matricule : 18F2327

Licencié en Biosciences (Microbiologie)



Sous la Co-Direction de :

NKOUDOU ZE Nardis

Chargé de Cours

Université de Yaoundé I

EYAMO EVINA Victor Jos

Chargé de Cours

Université d'Ebolowa

Année académique : 2023-2024

DEDICACE

Ce mémoire est dédié à ma famille

REMERCIEMENTS

Je tiens sincèrement à exprimer ma profonde gratitude et mes remerciements :

- Au Seigneur Dieu Tout Puissant pour avoir rendu ce travail possible ;
- Au Dr NKOUDOU ZE Nardis et au Dr EYAMO EVINA Victor Jos, pour avoir accepté de m'accompagner dans cette lourde tâche comme encadreurs tout en mettant à ma disposition les équipements adéquates et les conseils pratiques durant tout le processus de mes travaux ;
- Au Pr ESSIA NGANG Jean Justin, chef de Département de Microbiologie de l'Université de Yaoundé I et responsable du laboratoire de Microbiologie et au Pr NIEMENAK Nicolas chef du laboratoire de biochimie et physiologie végétales, cadre dans lequel une partie de ces travaux ont été réalisés ;
- Au Pr SADO KAMDEM Leroy, Pr TCHIKOUA Roger, Dr NKOUE Abraham, Dr EZO'O Fabrice, Dr BOUTCHOUANG Rodrigue, Dr YOUTE Sandrine et au Dr MOBOU Estelle pour les encouragements et orientations donnés ;
- M. KUATSE WABO Ivant et M. GODWE Joel qui ont suivi ce travail de près dès le début;
- Aux aînés et camarades de laboratoire: BEBINE Olivier Didier, EWANE Herman, TADOUANLA Mémoire, EZO'O EZO'O Dimitri, ETOUNDI Wilfried, OKAMBA Blanchard, FOGANG FOKA Désœuvres, FOPOSSI Delano, KENNE Ulrich, DJAMPOU Rosine, NELOUO Yvanelle, NIAKO Melissa, BAKEBAGNI Grace, pour leur assistance, leur expérience durant le travail en champ, les différentes manipulations en laboratoire, ainsi qu'à la rédaction de ce mémoire ;
- A mes parents MEYONG NGBWA Jean Pierre et EMVUTU Anne Marie , pour le soutien multiforme apporté ;
- A ma famille : NGBWA MEYONG Guy Roger, M et Mme ELOUNDOU, ZEH Nathalie, ZEH MEYONG Christian, ETITANE MEYONG Achille, MEYONG MEYONG Dany, NGBWA NGBWA Jean Daniel, ESSAME NGBWA

Jacqueline, NGONO NGBWA, NTYAM Marie Belle, MENGUE Hermine Nadège, feu NSEME Édith, pour tout leur soutien et leurs encouragements ;

- Au colonel et Ancien de l'Église EKO NLATE Martin Richard pour le soutien spirituel et financière ;
- A mes camarades de promotion ESSOMBA Angelica, ZE ABADA Loïc, VOUNDI MFULA, VOULA MFOULA Manuel, FOUMAN Bienvenu, FONGANG Roucel, DZOU Fouda, ANNE Christine, NKONGO ELALE Cheilby, AIME ARTHUR Mang, LISSOM Christine, NDJIWAKAM Soppi pour leurs encouragements ;
- A mes amis : MAFOUOMENE Nidele, ENGOLO ESSIANE Geneviève, ANGO Blaise, OWONO OWONO Cédric, KAGMENI PATIPE Edgard, KABEYEN Léonel Patrick, NGAKO Fabiola pour le soutien multiforme ;
- A toute la communauté chrétienne de la paroisse EPC ESSOS YAOUNDE notamment au regretté Révérend Pasteur MEBA OBAM Derubun, a l'ancien de l'Église EKONO NNA Albert, l'ancien de l'Église NDEMBA Jules Franck, l'ancien de l'Église AKONO NDEMBA, a l'ancien de l'Église TOUE Brice, l'ancien de l'Église SEMBONG Bertille, l'ancien de l'Église MINFOUMOU Nadège a toute la J.A.P.E de la paroisse ESSOS Yaoundé en générale et à la chapelle Judée en particulier pour le soutien financier et spirituel ;
- Et à tous ceux qui de prêt ou de loin ont donné de leur d'une manière ou d'une autre à l'accomplissement de ce travail, qu'ils trouvent ici toute ma considération et ma reconnaissance.

SOMMAIRE

DEDICACE.....	i
REMERCIEMENTS	ii
SOMMAIRE	iv
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES ABREVIATIONS.....	ix
RESUME.....	x
ABSTRACT	xi
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I :.....	4
REVUE DE LA LITTERATURE.....	4
I.1. Le Cacao.....	5
I.1.1. Généralité sur le cacao.....	5
I.1.1.1. Origine et description du cacao.....	5
I.1.1.2. Classification systématique et phylogénique du cacaoyer.....	5
I.1.1.3 Biologie et écologie du cacao	6
I.1.1.4. Variété du cacao et culture.....	6
I.1.1.5. Principaux bassins producteurs du cacao dans le monde :	7
I.2. Procédé post récolte de production	8
I.2.1. Ecabossage.....	8
I.2.2. Technique de préconditionnement : Le <i>Beans spreadings</i>	8
I.2.3 Fermentation des fèves de cacao	9
I.2.3.1 Techniques de fermentation.....	9
I.2.3.2. Phase de la fermentation et principaux acteurs	10
I.2.3.2.1. Différentes flore microbienne intervenant dans la fermentation de la pulpe présente et rôle de chacune.	10
I.2.3. Séchage et stockage	12

I.3. Normes et critères de qualité des fèves de cacao	13
I.3.1. Normes sur les fèves de cacao	13
I.3.2. Attributs technologiques.....	13
I.3.3. Attributs organoleptiques et sanitaires	13
CHAPITRE II :.....	16
MATERIEL ET METHODES	16
II.1. MATERIEL	16
II.2. METHODES.....	17
II.1.1.1. Sites d'étude et cadre expérimental.....	17
II.2.1. Détermination de la dynamique microbienne au cours de la fermentation.....	17
II.2.1.1. Récolte, écabossage.....	17
II.2.1.2. Dispositif expérimental et fermentation.....	17
II.2.1.3. Échantillonnage.....	18
II.2.2. Dénombrement des flores microbiennes	18
II.2.3. Evaluation des paramètres physico-chimiques	19
II.2.3.1. Mesure de la Température	19
II.2.3.2. Mesure du pH : pulpe, fèves fraîches et sèches	19
II.2.4. Evaluation des paramètres de qualité des fèves	20
II.2.4.1. Cut-test.....	20
II.2.4.2. Préparation des fèves	20
II.2.4.3. Indice de fermentation.....	21
II.2.4.4. Extraction et dosage des composés phénoliques : Polyphénols totaux et Flavonoïdes	21
II.2.4.5. Dosage des anthocyanines	22
CHAPITRE III :	23
RESULTATS ET DISCUSSION.....	23
III.1. RESULTATS.....	48
III.1.1. Effet de la durée du <i>Beans spreading</i> sur l'évolution des levures et des bactéries au cours de la fermentation.....	48
III.1.2. Effet de la durée du <i>Beans spreading</i> sur les paramètres physico-chimiques et de qualités du milieu de fermentation et de la fève	50
III.1.2.1 Effet de la durée du <i>Beans spreading</i> sur les paramètres physico-chimiques	50
III.1.2.2 1 Effet de la durée du <i>Beans spreading</i> sur les paramètres de qualité des fèves	51

III.1.2.2. Indice de fermentation.....	53
III.1.2.3. Polyphénols Totaux.....	54
III.1.2.4. Anthocyanines	55
III.1.3. Corrélations entre les paramètres biochimiques et la dynamique microbienne....	56
III.2. DISCUSSION.....	58
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	49
IV.1. CONCLUSION	53
IV.2. PERSPECTIVES.....	54
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	52
ANNEXES	52

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Plant de cacaoyer avec fruits matures	5
Figure 2. Coupe interne d'une cellule du cotylédon après la réduction des composés phénoliques ..	122
Figure 3. Fèves de cacao : en fermentation dans une caisse (A), en cours de séchage (B) et sèches (C)	12
Figure 4. Cabosses de cacao matures (A) ; Écabossage (B) ; Fèves fraîches retirées (C)	17
Figure 5. Fèves de cacao étalées (A & B) ; Fèves de cacao en fermentation (C).....	18
Figure 6. Evolution des flores microbiennes au cours de la fermentation en fonction du temps de fermentation A : levures ; B : bactéries acétiques.....	49
Figure 7. Variation de la température, du pH des levures et bactéries acétiques au cours de la fermentation: A : Bibe et B : Nkometou	Erreur ! Signet non défini.
Figure 8. Evolution de la coloration interne des fèves au cours de la fermentation en fonction du temps de fermentation par traitement	52
Figure 9. Evolution des indices de fermentation au cours de la fermentation en fonction du temps de fermentation Bibe A et Nkometou B.....	54
Figure 10. Teneur en composé phénolique au cours de la fermentation en fonction du temps de fermentation A : Bibe et B : Nkometou.....	55
Figure 11. Teneur en anthocyanines dans les fèves en fonction du temps de fermentation: Bibe (A) et Nkometou (B)	56
Figure 12. Corrélations multivariées entre les variables ; A : Bibe et B : Nkometou. IF= Indice de Fermentation ; Lev= Levures ; Acet= Bactéries acétique ; ppt= polyphénols totaux ; anths= anthocyanines	57

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Les Huit (08) premiers producteurs du cacao dans le monde (Anonyme 2, 2024)	8
Tableau II : Composition de la fève fermentée et séché.....	13
Tableau III : Nombre des fèves brunes <i>dans 1000 fèves</i> (Site de Bibe).....	5353

LISTE DES ABREVIATIONS

AAB	:	<i>Acid Acetic Bacteria</i>
°C	:	Degré Celsius
D.O	:	Densité optique
EAG	:	Extrait d'Acide Gallique
g		Gramme
GYC	:	<i>Glucose Yeast extrait CaCO₃</i>
ICCO	:	<i>International Cocoa and Coffee Organisation</i>
I.F	:	Indices de fermentation
LAB		<i>Lactic Acid Bacteria</i>
Log	:	Logarithme
MeOH	:	Méthanol
ml	:	Millilitre
OICC	:	International Cocoa organization
ONCC		Office National du Cacao Café
Pdc	:	Poudre de cacao
T0HJ0	:	Traitement 0 Heure jour 0
T6HJ1	:	Traitement 6 Heures jour 1
T12HJ3	:	Traitement 12 Heures jour 3
T18HJ5	:	Traitement 18 Heures jour 5
UFC	:	Unité Formant Colonie
YMA	:	<i>Yeast Mannitol Agar</i>

RESUME

Les transformations biochimiques s'opérant dans la fève de cacao sont inhérentes aux activités microbiennes associées à la fermentation du cacao. Dans cette étude il est question de déterminer l'influence de la durée du *Beans spreading* sur la dynamique microbienne et sur la qualité de la fève au cours de la fermentation. Le *Beans spreading* est une technique de préconditionnement des fèves de cacao, il consiste à leur étalage avant la mise en fermentation. Dans cette étude, les fèves de cacao ont été étalées sur une bâche à température ambiante à différents temps avant la mise en fermentation. Suite à cela un dénombrement des levures et bactéries, suivi d'une analyse des paramètres physico-chimiques et de qualité de la fève ont été effectués. Les résultats obtenus montrent que l'étalage des fèves pendant 12h et 18h augmentent les charges en levure et en bactéries acétiques dès la mise en fermentation (au jour 0) par rapport à l'étalage de 6h et au témoin (0h), soit une différence d'environ 2 log UFC/g pour les levures et 1 log UFC/g pour les bactéries acétiques. Ces traitements présentent également des pics de température (42,5°C) et une chute rapide du pH interne de la fève entre 24h et 48h de fermentation contrairement aux autres qui présentent les leurs après 72h. Il en est de même de l'indice de fermentation qui est sensiblement égale à 1 et une forte réduction de la teneur en polyphénols totaux et en anthocyanines dès le 3^e jour de fermentation contrairement au traitement 6h et au témoin où l'indice de fermentation et la réduction maximale des polyphénols totaux et anthocyanes sont obtenus au 4^e et 5^e jour de la fermentation. Les résultats obtenus dans cette étude montrent que l'étalage des fèves entre 12 heures et 18 heures avant la mise en fermentation a un effet bénéfique sur la dynamique microbienne par conséquent sur la qualité de la fève, on peut ainsi recommander cette technique aux cacaoculteurs.

Mots clés : Fermentation ; cacao ; *Beans spreading* ; levures ; bactéries lactiques ; bactéries acétiques ; composés phénoliques et anthocyanes.

ABSTRACT

The biochemical transformations occurring in the cocoa bean are inherent to the microbial activities associated with cocoa fermentation. This study aims to determine the influence of the duration of Beans spreading on microbial dynamics and bean quality during fermentation. Beans spreading is a technique for preconditioning cocoa beans; it consists of spreading them out before fermentation. In this study, cocoa beans were spread out on a tarpaulin at room temperature at different times before fermentation. Following this, a count of yeasts and bacteria was carried out, followed by an analysis of the physicochemical and bean quality parameters. The results obtained show that spreading the beans for 12 and 18 hours increases the yeast and acetic bacteria loads from the start of fermentation (on day 0) compared to the 6-hour spreading and the control (0 hours), i.e., a difference of approximately 2 log CFU/g for yeasts and 1 log CFU/g for acetic bacteria. These treatments also present temperature peaks (42.5°C) and a rapid drop in the internal pH of the bean between 24 and 48 hours of fermentation, unlike the others which present theirs after 72 hours. The same is true of the fermentation index which is approximately equal to 1 and a strong reduction in the content of total polyphenols and anthocyanins from the 3rd day of fermentation, unlike the 6-hour treatment and the control where the fermentation index and the maximum reduction of total polyphenols and anthocyanins are obtained on the 4th and 5th day of fermentation. The results obtained in this study show that spreading beans between 12 and 18 hours before fermentation has a beneficial effect on microbial dynamics and therefore on bean quality, and this technique can be recommended to cocoa farmers.

Key words: Fermentation; cocoa; Beans spreading; yeasts; lactic acid bacteria; acetic acid bacteria; phenolic compounds and anthocyanins.

INTRODUCTION

Le cacaoyer (*Theobroma cacao L.*) est un arbre originaire du bassin amazonien dans l'Amérique centrale et du Sud (Efombagn *et al.*, 2008 ; Motamayor *et al.*, 2008). La culture du cacao s'est développée sur une cinquantaine de pays producteurs dans le monde entier, elle est divisée en trois principaux bassins que sont l'Afrique (76 %), l'Amérique latine (18 %) et l'Asie (6 %). La production mondiale du cacao durant la saison 2022-2023 a été évaluée à 5 millions de tonnes environ. Les produits finis du cacao tels que la poudre, le beurre et l'huile présentent de nombreuses vertus (propriétés anticancérigène, anti-inflammatoire, anti-oxydant, antidépresseur, neurodégénérative, et cardiovasculaire) ceci de par leur composition biochimique avec les molécules bioactives qu'ils possèdent tel que les polyphénols, les flavonoïdes, anthocyanines ce qui fait des fèves de cacao un produit incontournable pour certaines industries agroalimentaires en particulier l'industrie de chocolat ainsi que les industries cosmétiques et pharmaceutiques (Pereira *et al.*, 2013).

Le traitement post-récolte du cacao constitue un ensemble d'opérations visant à améliorer la fève de cacao. Parmi ces opérations, la fermentation est un processus clé dans la production des fèves de cacao de qualité prisées par les industries chocolatières. Elle est divisée en deux grandes étapes : la fermentation externe appelée encore fermentation microbienne qui consiste à la dégradation plus ou moins rapide de la pulpe est menée de façon progressive par les levures qui produisent l'éthanol, puis viennent les bactéries lactiques et enfin les bactéries acétiques qui produisent l'acide acétique à partir de l'éthanol produit par les levures. La deuxième étape consiste à la pénétration des acides à l'intérieur des fèves provoquant une baisse de pH, une désorganisation des enveloppes des différents compartiments. Il en résulte des réactions biochimiques suite aux contacts des substrats et leurs enzymes telles que l'oxydation des composés phénoliques (procyanidines et les anthocyanines) et leur exsudation, réduisant ainsi l'astringence et l'amertume dans la fève (Cros E., Jeanjean N. 1995 ; Ho *et al.*, 2014). La dégradation des protéines en peptides et en acides aminés et enfin la dégradation du sucrose en fructose et glucose. Ces produits de dégradations constituent les principaux précurseurs d'arômes (Pereira *et al.*, 2012).

La fermentation est un processus qui se fait de façon spontanée et artisanale, afin de satisfaire les exigences des industries agro-alimentaires en termes de critères physico-chimiques et organoleptiques plusieurs travaux ont été menés sur la fermentation. Tels que Essia *et al.* (2015) et Batista *et al.* (2015) qui ont menés des travaux sur la formulation et l'utilisation des starters microbiologiques et enzymatiques avec des résultats intéressants aussi sur la vitesse de la dégradation de la pulpe que sur la qualité des fèves obtenues. Cependant les

starters n'étant pas à la portée des petits exploitants, d'autres stratégies efficaces ont été développées bien avant le starter : l'application des techniques de préconditionnement. Afoakwa *et al.* (2013) ont démontré que le préconditionnement des cabosses (*Pod storage*) pendant 7 à 14 jours avait une influence positive sur les qualités physiques et organoleptiques des fèves obtenues avec une réduction de temps de fermentation entre 3 et 5 jours. Outre la *pod-storage*, il y a aussi le *Beans spreading* très peu connu car les travaux approfondis sont peu menés. Il s'agit d'une technique de pré conditionnement des fèves de cacao après écabossage, elle consiste à étaler les fèves de cacao sur une légère pente à température ambiante pendant un certain temps avant la mise en fermentation. Au départ utilisé dans le but de réduire la pulpe mucilagineuse (la teneur en eau et en sucre) afin de minimiser la présence de l'acide dans la fève. Les travaux de Biehl & Meyer (1990) ont montré que le *Beans spreading* permettait de réduire la concentration d'acide dans les fèves fermentées. Cependant, la vulgarisation de cette technique nécessite des travaux approfondis afin de déterminer si elle serait efficace et permettrait l'obtention des fèves aux qualités désirables. Quelle serait la durée minimale du *Beans spreading* pouvant influencer de façon efficace la dynamique microbienne au cours de la fermentation et permettant l'obtention des fèves appréciables ? une certaine durée minimale du *Beans spreading* modifierait la dynamique microbienne au cours de la fermentation et améliorerait la qualité des fèves.

L'objectif général de ce travail est d'évaluer l'influence de la durée du *Beans Spreading* sur la dynamique microbienne au cours de la fermentation et sur la qualité de la fève. Plus spécifiquement il est question suivant les durées de *Beans spreading* de :

- Déterminer l'évolution des levures et bactéries au cours de la fermentation ;
- Évaluer les paramètres physico-chimiques de la fève et du milieu de fermentation au cours de la fermentation ainsi que les paramètres de qualité de la fève après séchage.

CHAPITRE I :

REVUE DE LA LITTERATURE

I.1. Le Cacao

I.1.1. Généralité sur le cacao

I.1.1.1. Origine et description du cacao

Le cacaoyer est un arbre qui pousse principalement dans les forêts tropicales et pluvieuses (Motamayor *et al.*, 2008 ; Deheuvels, 2011 ; Kongor *et al.*, 2016).



Figure 1. Plant de cacaoyer avec fruits matures

Les premières traces du cacao remontent à 5300 avant notre ère, il existait depuis très longtemps et était consommé sous plusieurs formes depuis des milliers d'années. Des documents archéologiques récents révèlent que les Olmèques, les Aztèques, les Mayas du Mexique et d'Amérique utilisaient le cacao comme boisson lors de cérémonies religieuses et rituels divers. Le cacao n'était pas seulement consommé comme boisson, mais servaient également de monnaie d'échange pour ces pays. Le cacao a été découvert en Espagne en 1494 où on lui donne le nom de *theobroma cacao* ce qui signifie nourriture des dieux. Après la colonisation le cacao a été exporté en Europe où il sera consommé sous forme de confiseries et de breuvages (Mossu, 1990).

I.1.1.2. Classification systématique et phylogénique du cacaoyer

Withlock et al. (2001) a proposé la classification du cacao comme suit :

Domaine : Eukaryote

Règne : Plantae

Embranchement : Spermaphytes

Classe : Dicotylédones

Ordre : Malvales

Famille : Malvacées

Genre : Theobroma

Espèce : *Theobroma cacao*

I.1.1.3 Biologie et écologie du cacao

La température optimale de développement du cacao est comprise entre 25 à 30°C et une humidité d'environ 85% ce qui est à l'origine de la forte culture de ce dernier dans la zone tropicale (CNUCED, 2022). Le cacao mesure entre 5 et 10 mètres. La production du cacao commence par l'apparition des fleurs au niveau de la tige et des branches, ces fleurs se transforment progressivement en chérelles (petites cabosses en développement) qui deviennent plus tard des fruits matures et murs (Motamayor *et al.*, 2008 ; Moujouenpou, 2008 ; Kongor *et al.*, 2016). Les fruits matures du cacao (cabosses) pèsent entre 380 et 450 grammes et mesurent entre 15 et 20 cm. Le nombre de fèves présentes dans une cabosse varie de 30 à 40 ce qui est équivalent à 100g en fonction de la variété, les fèves sont entourées d'une pulpe mucilagineuse riche en eau (80% environ) ; en sucres fermentescibles tels que glucose ; fructose et saccharose (10 à 15% environ) ; en acide citrique entre 1 et 3 %, 1 à 1,5 % de pectine, et d'autres polysaccharides hémicellulosiques 1 à 2 %. La fève de cacao fraîche et mature est constituée de : 80% d'eau environ ; de 10 à 20% de sucre environ ; 2% d'acide citrique ; 2% de protéine ; 1,5% de pectine ; 0,05% de sulfate de magnésium ; 0,02% du sulfate de manganèse ; et d'un pH compris entre 6 à 6,5 en fonction du degré de maturité de la cabosse (Lefebert T. *et al.*, 2011). La graine comporte deux cotylédons (Schwan, 1996 ; Kongor *et al.*, 2016 ; Guzman Alvarez *et al.*, 2021).

I.1.1.4. Variété du cacao et culture

On distingue classiquement trois groupes de cacao : les ***Criollos***, les ***Forasteros*** et les ***Trinitarios***. Toutefois, les récentes avancées de la recherche montrent qu'il existe en réalité **10 groupes** de cacaoyer, toutes originaires d'Amazonie: *Amelonado*, *Cacao guiana*, *Contamana*, *Criollo*, *Curaray*, *Iquitos*, *Marañon*, *Nacional*, *Nanay* et *Purús* (Motamayor *et al.*, 2008) . Cette classification plus précise est essentielle à une sélection plus raisonnée des variétés (en fonction, de leur capacité à résister aux maladies par exemple) et une meilleure gestion des plantations. Ces variétés se distinguent à la fois par leur origine géographique et par des critères morphologiques et génomiques (Motamayor *et al.* 2008 ; Moujouenpou, 2008).

❖ **La variété de cacao *Forastero*:**

Elle représente environ 80% de la production mondiale (ce type de cacaoyer est robuste et facile à cultiver). Originnaire de l'Amérique du sud, elle est aussi cultivée dans les régions de l'Equateur et en Afrique. Le *forastero* est une espèce très résistante et productive, il donne un cacao amer et corsé. La cabosse est arrondie et lisse ses graines sont aplaties avec les cotylédons noirs violets. La durée de fermentation du *forastero* varie entre 5 et 10 jours car considérée comme une variété sauvage (Tankou, 2010; Kongor *et al.*, 2016).

❖ **La variété de cacao *Criollos*:**

Elle correspond à environ 5% de la production mondiale. Les *Criollos* produisent des cacaos fins, très aromatiques et sont par conséquent réservés aux chocolats d'exception. On trouve principalement des cacaoyers criollo au Venezuela, aux Antilles, au Mexique, en Colombie. Les *criollos* réputé comme meilleurs et réservés au chocolat de luxe. Leurs cabosses sont allongées et pointues et des graines larges avec des cotylédons de couleur blanche. Elles ont un gout légèrement amer et la durée de fermentation varie de 2 à 3 jours (Kongor *et al.*, 2016).

❖ **La variété de cacao *Trinitarios* :**

Elle représente environ 10 à 15% de la production mondiale et est issue d'un croisement entre les variétés *Criollos* et *Forasteros*. Elle est originaire de Trinidad, une île au large du Venezuela, mais est aussi cultivée au Brésil, au Venezuela, au Mexique et aussi au Cameroun. Le Trinitario, a des cabosses de forme diverses ses graines ont des cotylédons de couleur moins violet avec un gout intermédiaire et une résistance moyenne (Motamayor *et al.*, 2008).

I.1.1.5. Principaux bassins producteurs du cacao dans le monde :

On distingue trois principaux bassins de production de cacao dans le monde à savoir : Le bassin d'Amérique du Sud, d'Amérique centrale et les Caraïbes donc les pays concernés sont le Brésil, l'Equateur et le Mexique ; Le bassin du Mékong et d'Océanie où on rencontre particulièrement l'Indonésie, la Malaisie et le Vietnam et en fin le bassin du Golfe de Guinée avec la Côte d'Ivoire, le Ghana, le Cameroun et Nigéria comme principaux producteurs (Tankou, 2010).

Tableau I : Les Huit (08) premiers producteurs du cacao dans le monde (Anonyme 2, 2024)

PAYS	Production mondiale en milliers de tonnes métriques					
	2017/2018	2018/2019	2019/2020	2020/2021	2021/2022	2022/2023
Cote D’Ivoire	1.964	2.150	2.105	2.248	2.200	2.230
Ghana	905	900	771	1.047	822	750
Equateur	285	298	342	365	370	370
Cameroun	250	250	280	290	290	300
Nigeria	255	245	250	290	280	280
Brésil	204	195	201	200	210	220
Indonésie	240	220	200	170	180	200
Papouasie	40	38	41	42	42	42

I.1.1.6. Le cacao au Cameroun

Le Cameroun est classé 4ème producteur mondiale avec une production estimée à environ 300 000 tonnes (OICC, 2023). La culture du cacao participe à l’économie de plus de deux millions de personnes en zone rurale au Cameroun. Le cacao a été introduit au Cameroun à la fin du 19ème siècle par les colons occidentaux, ceci en deux période. Premièrement en 1876 par les missionnaires anglais il s’agit de la variété Trinitarios. La variété Forasteros provenant de Sao-Tomé et de l’île de Fernando Pô entre cacao au Cameroun en 1892 par les allemands. Les bassins de production du cacao au Cameroun sont respectivement dans les régions du Centre ; Sud-Ouest ; Littoral et le Sud (Efombagn *et al.*, 2009).

I.2. Procédé post récolte de production

I.2.1. Ecabossage

Lorsque les cabosses de cacao sont mûres (matures) elles sont récoltées soit à l’aide d’une machette soit à l’aide d’une petites faucille double tranchante au bout d’une perche. Quelques jours après la récolte les cabosses sont soumises à l’ecabossage processus durant lequel la cabosse de cacao est ouverte à l’aide d’un goudin ou d’une machette pas tranchante puis les fèves retirées à la main (Motamayor *et al.* 2008).

I.2.2. Technique de préconditionnement : Le *Beans spreadings*

Le *Beans spreadings* est une technique de prétraitement qui consiste à étaler les fèves de cacao sur une bâche à température ambiante pendant des intervalles de temps régulier (ce qui constitue le traitement) avec pour but de réduire la pulpe mucilagineuse avant la mise en fermentation ceci après ecabossage. En Malaisie, l’étalage de fèves a été étudié comme méthode alternative au stockage des cabosses pour le pré conditionnement de la pulpe afin de réduire

l'acidité des fèves lors de la fermentation. Une diminution du volume, de la teneur en eau et en sucre a été observée au cours de l'étalage (Biehl et Meyer, 1989 ; E. Afoakwa et Kongor, 2014).

De par sa composition (riche en eau et en sucre réducteur) la pulpe est un milieu approprié pour la croissance des microorganismes. La quantité de sucre contenue dans la pulpe dépend du niveau de maturité du fruit, cette maturité augmente davantage les sucres réducteurs tels que le glucose et le fructose (Rahardjo *et al.*, 2022). Le préconditionnement de la pulpe consiste à modifier les propriétés ses avant la mise en fermentation et puisque la pulpe est le substrat métabolisé pendant la fermentation, son changement affectent la production de l'alcool par les levures par conséquent la production des acides par les bactéries lactiques et acétiques (Biehl et Meyer, 1989 ; E. Afoakwa *et al.*, 2014).

I.2.3 Fermentation des fèves de cacao

La fermentation est une étape importante du traitement post-récolte qui régit principalement la qualité finale du produit (Lagunes Galvez *et al.*, 2007 ; De Vuyst et Weckx, 2016). Elle débute par l'action des levures en milieu anaérobique, les levures transforment les sucres présents dans la pulpe en éthanol (Pereira *et al.* 2012). Après l'épuisement des sucres fermentescibles les levures consomment l'acide citrique présents dans la pulpe, cette réduction de l'acide citrique, la désagrégation du mucilage et le brassage des fèves enrichissent le milieu en oxygène ce qui favorise l'installation des flores lactique et acétique. Les bactéries lactiques interviennent en second plan en transformant les sucres et quelques fois l'acide citrique en acide lactique. En fin interviennent les bactéries acétiques qui transforment l'éthanol issue de la fermentation alcoolique des levures en acide acétique, ce qui entraine une baisse du pH à l'intérieur de la fève et une augmentation de la température du milieu de fermentation. Les feuilles de bananiers sont souvent utilisées pour l'apport naturel et supplémentaire en microorganismes et permet un isolement naturel du milieu de fermentation et du milieu extérieur. Le but de la fermentation est d'une part de réduire le mucilage de la pulpe qui l'entoure les fèves afin de faciliter le séchage, d'autre part d'anéantir la capacité germinative de l'embryon pour une conservation prolongée ce qui provoque en même temps le développement des précurseurs d'arômes et la diminution de l'amertume et de l'astringence dans la fève (Cros E., Jeanjean N. 1995 ; Ho *et al.*, 2014 ; De Vuyst et Weckx, 2016).

I.2.3.1 Techniques de fermentation

Suivant les conditions et dispositions géographique il existe plusieurs techniques de fermentation entre autres la fermentation en caisses ou en box, la fermentation en tas, la

fermentation en bois, en panier et en sacs pour certains. Dans chacun des cas précédents les feuilles de bananiers peuvent servir d'isolant sur la partie supérieure des caisses/paniers/box (Cros E., et Jeanjean N., 1995; Ho *et al.*, 2014).

I.2.3.2. Phase de la fermentation et principaux acteurs

La fermentation des fèves se passe à deux niveaux. La fermentation microbiologique au niveau des pulpes et les réactions biochimiques au niveau des cotylédons. Elle débute au niveau de la pulpe mucilagineuse les microorganismes (Cros E., et Jeanjean N., 1995).

I.2.3.2.1. Différentes flore microbienne intervenant dans la fermentation de la pulpe présente et rôle de chacune.

Les microorganismes qui interviennent dans la fermentation au niveau de la pulpe sont les levures; les bactéries lactiques et les bactéries acétiques (Thanh PB *et al.*, 2017; Guzman Alvarez *et al.*, 2021)

- Les Levures

Les levures sont présentes massivement dans le milieu durant les premières 24 heures de la fermentation (Ban Koffi *et al.*, 2013; Guzman Alvarez *et al.*, 2021). Suivant les zones géographiques les espèces intervenantes sont :

- *Saccharomyces bayanus*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida lambica*, *Candidat rugosa*, *Saccharomycopsis fibuligera*, *Saccharomycopsis fermentant*, *Hanseniospora opuntiae*, *Hanseniospora thailandica* et *Kloeckera sp* (Guzman Alvarez *et al.*, 2021)

- *Saccharomyces cerevisiae* (tolérant à l'avis, à la chaleur et à l'éthanol), *Hanseniaspora guilliermondii*, *Pichia kudriavzevii* (Lagunes Galvez *et al.*, 2007 ; Pereira *et al.*, 2012 ; Ho *et al.*, 2014)

Les levures fermentent les sucres (glucoses) et l'acide citrique présents dans la pulpe en éthanol (Pereira *et al.*, 2012; De Vuyst *et al.*, 2016), suivant la réaction :

Fermentation alcoolique anaérobie par les levures :



- Les Bactéries Lactiques

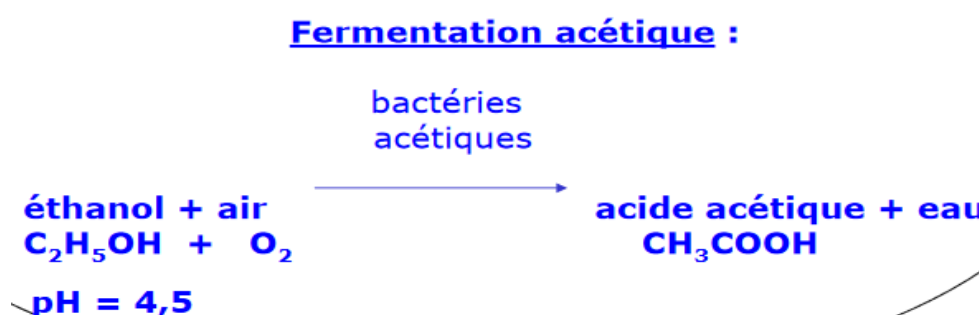
Les bactéries Lactiques présentent massivement dans le milieu après 48 à 60h à une température comprise entre 40°C et 50°C en fonction de la masse fermentaire (Ban Koffi *et al.*, 2013; De Vuyst *et al.*, 2016) et 24 heures après la mise en Fermentation. Les espèces présentes sont :

- *Lactobacillus plantarum*; *Lactobacillus cellobiosus*; *Lactobacillus fermentum* (M. Ardhana 2003; Ho *et al.*, 2014) qui transforme le glucose, le fructose et l'acide citrique du milieu en acide lactique tolérant à la chaleur, à l'acide lactique et à l'éthanol (Pereira *et al.*, 2012; De Vuyst *et al.*, 2016).

- Les Bactéries Acétiques

Les bactéries acétiques sont présentes massivement dans le milieu après 66 à 72 heures et 48 heures après la mise en fermentation à une température comprise entre 40°C et 50°C (Ban Koffi *et al.*, 2013 ; De Vuyst *et al.*, 2016). Les espèces présentes:

- *Acetobacter tropicalis* (tolérant à l'acide, à la chaleur et à l'éthanol), *Acetobacter pasteurianus* (résistant à l'acide et à la chaleur, et sa croissance préférentielle en présence d'acide lactique et de mannitol), *Gluconobacter frateurii* *Acetobacter ghanensis*, *Acetobacter senegalensis*, *Acetobacter lovaniensis*, *Acetobacter Syzygii*, *Acetobacter pomorum*, *Acetobacter cibirongensis* (Camu *et al.*, 2008 ; Garcia *et al.*, 2010 ; Romero T. *et al.*, 2011; Ho *et al.*, 2014 ; Guzman Alvarez *et al.*, 2021). Elles transforment l'éthanol en acide acétique, cette réaction est une réaction exothermique (Romel E. *et al* 2021).



I.2.3.2.2. Au niveau des cotylédons

A l'intérieur de la fève se passe de réaction hydrolytique causée par l'entrée des acides dans le cotylédon. Cette entrée massive des acides organiques couplée à l'augmentation de la température entraînent la mort de l'embryon provoquant des réactions biochimiques au seins des cotylédons ce qui engendre la synthèse des précurseurs d'arômes du chocolat tels que les acides aminés et sucres simples (Pereira *et al.*, 2012). Au cours de cette phase, il y a diminution

des saveurs amères et de la sensation astringentes qui sont dues à une forte présence des composés phénoliques tels que les catéchines, les flavan-3-ols. Les anthocyanes sont convertis en anthocyanidines par les enzymes glucosidases, ces anthocyanidines sont oxydées par la polyphénol oxydase en quinone qui se combine avec des acides aminés et des protéines pour former de la mélanine (Biehl B. *et al.*, 1989 ; E. Afoakwa *et al.*, 2014 ; De Vuyst et Leroy, 2020). Les polyphénols présents dans la fève, sont oxydés par les polyphénols oxydases pour produire les tanins, ce qui entraîne une diminution de la teneur en polyphénol d'environ 80% (Vincent *et al.*, 1983 ; Vitaglione *et al.*, 2013).

I.2.3. Séchage et stockage

L'étape qui suit la fermentation est celle du séchage. Il se fait naturellement (au soleil) ou artificiellement (dans des fours). Le séchage permet l'arrêt total de la fermentation, la réduction de la teneur en eau et de l'humidité des fèves de 55% à 7% afin de garantir une bonne conservation du produit (Cros E., et Jeanjean N., 1995).

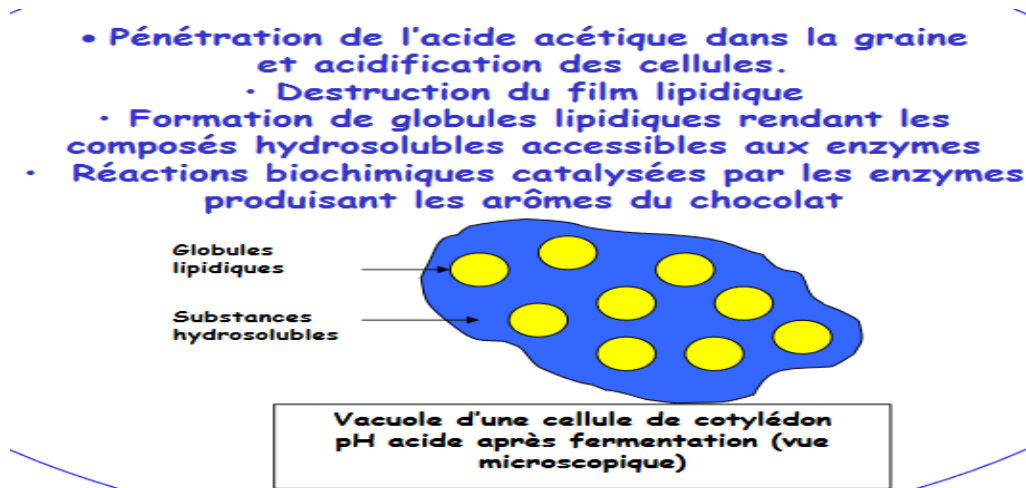


Figure 2. Coupe interne d'une cellule du cotylédon après la réduction des composés phénoliques

L'étape de stockage est celle qui précède l'exploitation du cacao, ceci se fait dans un environnement à faible humidité et température ambiante (Vincent *et al.*, 1983)



Figure 3. Fèves cacao : en fermentation dans une caisse (A), en cours de séchage (B) et sèches(C)

I.3. Normes et critères de qualité des fèves de cacao

I.3.1. Normes sur les fèves de cacao

La norme ISO 2451 relative à la « Spécifications des fèves de cacao », canalise la commercialisation des fèves de cacao dans le monde, elle a été publiée en 1973 et révisée en 2014 pour l'adapter aux pratiques commerciales actuelles et aux nouvelles exigences des parties intéressées. La norme ISO 2451 oriente sur un ensemble de processus liés à l'évaluation de la qualité des fèves de cacao marchande tels que le mode d'échantillonnage, la réalisation de l'épreuve à la coupe (Cut test) et la détermination de la teneur en humidité (méthode pratique).

Tableau II : Composition de la fève fermentée et séchée (Vincent *et al.*, 1983)

	Graine Maximum%	Cosse Maximum%
Eau	3.2	6.6
Graisse (beurre de cacao, graisse de la cosse)	57	5.9
Cendres	4.2	20.7
Azote		
Azote total	2.5	3.2
Théobromine	1.3	0.9
Caféine	0.7	0.3
Amidon	9	5.2
Cellulose brute	3.2	19.2

I.3.2. Attributs technologiques

Les attributs technologiques du cacao constituent l'ensemble des informations qui renseignent sur la teneur en matière grasse ; la teneur en eau ; la taille des graines ; la couleur du cotylédon (brun, violet ou ardoisé) ; la teneur en acide gras libre et l'odeur ceci est conditionné par les pratiques post-récolte (Biehl B. *et al.*, 1989).

I.3.3. Attributs organoleptiques et sanitaires

Les attributs organoleptiques sont relatifs : Au goût et sensation dont l'astringence, l'amertume et l'acidité ; à la couleur qui peut être noire, violette ou brune voir intermédiaires et aux arômes ce qui est l'œuvre des microorganismes et des enzymes.

Les attributs sanitaires tiennent compte de la présence des produits nocifs tels que les pesticides, les métaux lourds ; mycotoxine et de toxines chez les consommateurs (Biehl B. *et al.*, 1989).

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II.1. MATERIEL

Pour réaliser ce travail le matériel ci-après a été nécessaire:

- Le matériel biologique constitué des fèves de cacao issus des cabosses sur lesquelles la quasi-totalité des analyses ont été effectuée;
- Des milieux de culture pour le dénombrement des différentes flores au cours de la fermentation. Le milieu Yeast Mannitol Agar (YMA), Glucose Yeast CaCO_3 (GYC) et la gélose au jus de tomate, la composition de ces milieux figure à l'annexe 4;
- Quelques réactifs tels que le méthanol, l'éthanol, le Folin ciocaltciu et autres solutions tampon pour l'extraction et le dosage des polyphénols et anthocyanes ;
- Un appareillage et une verrerie en annexe (Annexe 5).

II.2. METHODES

II.1.1.1. Sites d'étude et cadre expérimental

Dans le cadre de cette étude, deux sites constituant des zones de production de cacao au Cameroun ont été retenues. Le premier site d'étude dans une plantation cacaoyère du village **BIBE**, situé au département de la **Méfou-Akono** ($N03^{\circ}43.352'E011^{\circ}24.899'$) et le second site dans une plantation du village **Nkometou** situé dans le département de la **Lekié** ($N04^{\circ}05.362'E011^{\circ}32.455'$) tous les deux dans la région du Centre au Cameroun. Les analyses microbiologiques ont été faites au laboratoire de microbiologie de la Faculté des Sciences et les analyses des paramètres physico-chimique et de qualité de la fève au laboratoire de biochimie et de physiologie végétales de l'Ecole Normale Supérieure tous les deux à l'Université de Yaoundé I.

II.2.1. Détermination de la dynamique microbienne au cours de la fermentation

II.2.1.1. Récolte, écabossage

Ces phases se sont déroulées dans les deux sites cités plus haut. Dans chaque site, les cabosses matures (*German cocoa*) ont été récoltées puis écabossées à l'aide d'une machette non tranchante. Les fèves récoltées ont été transportées du lieu de l'écabossage au lieu de fermentation dans les récipients (en plastique et en acier) à l'aide d'une bourrette figure 4.



Figure 4. Cabosses matures (A) ; Écabossage (B) ; Fèves fraîches retirées (C)

II.2.1.2. Dispositif expérimental et fermentation

- Dispositif expérimental

Une fois au lieu de fermentation, les fèves ont été réparties en quatre lots de 25 kilogrammes chacun ; dont trois lots ont été étalés sur une bâche avec une pente de 30° environ à température ambiante respectivement pendant 6 heures, 12 heures, et 18 heures (qui correspond à la durée du *Beans spreading*) avant la mise en fermentation. Le quatrième lot quant à lui a immédiatement été mis en fermentation sans *Beans spreading* et a servi de lot

temoin. La mise en fermentation s'est faite dans des paniers de 25 dm³ de volume avec deux répétitions couvertes par des feuilles de bananier et la fermentation a duré 5 jours suivi d'un brassage à main tous les deux jours.



Figure 5. Fèves de cacao étalée (A & B) ; Fèves de cacao en fermentation (C)

II.2.1.3. Échantillonnage

Les échantillons des fèves ont été collectés quotidiennement en deux lots 100 et 500 grammes. Le lot de 100 grammes prélevés à l'aide des gants à différents endroits et à différentes profondeurs de la masse fermentaire a été mis dans des plastiques zip stérile et conservé immédiatement dans de la glace puis acheminés au laboratoire de Microbiologie pour des analyses microbiologique, et le lot de 500 grammes transporté dans les plastiques au laboratoire de biochimie et physiologie végétales de l'Ecole Normale Supérieur (Université de Yaoundé I) pour séchage et conservation pour les analyses physico-chimiques et biochimiques.

II.2.2. Dénombrement des flores microbiennes

Une fois au laboratoire, 10 grammes de fèves de cacao (environ 10 fèves) de chaque échantillon ont été diluées dans 90ml d'eau physiologique stérile contenu dans un sac stomaher puis homogénéisés pendant 2 minutes. La suspension obtenue à l'issue de l'homogénéisation a subi une série de dilutions décimales allant de 1 à 12. Un volume d'un millilitre (1ml) de chacune des trois dilutions successives retenues en fonction des jours et des flores recherchées a été introduit dans les boites de Petri préalablement étiqueté (flore-dilution), par la suite 15ml de milieux de culture spécifiques préparer en avance ont été ajouté et homogénéisé avant la prise en masse. Le milieu YMA (Yeast Mannitol Agar) supplémenté au Chloramphénicol pour le dénombrement des levures ; le milieu GYC (Glucose Yeast Calcium Carbonat) supplémenté au Fluconasol et à la Pénicilline pour le dénombrement des bactéries acétiques et la Gélose au jus de Tomate supplémenté au Fluconasol pour le dénombrement de la flore Lactique. Les ensemencements se sont effectués en duplicata pour chaque dilution dans le même milieu de

culture. Une fois les boîtesensemencées et les milieux coulés, les botes ont été incubées à température ambiante pendant 24 à 48 heures. Le dénombrement s'est fait par comptage des colonies après incubation et la concentration des micro-organismes en UFC par g présente dans un échantillon de départ a été déterminée grâce à la moyenne pondérée de deux dilutions décimales successives à l'aide de la formule ci-après :

$$N = \frac{\sum C}{v (n_1 + 0,1 \times n_2) d}$$

- **N** : nombre d'UFC par mL,
- **ΣC** : somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues.
- **n₁** : nombre des boîtes retenues à la première dilution,
- **n₂** : nombre des boîtes retenues à la deuxième dilution,
- **d** : taux de dilution de la première dilution.
- **v** : volume de l'inoculum.

II.2.3. Evaluation des paramètres physico-chimiques

L'analyse des paramètres physico-chimiques s'est articulée autour de la prise de la température du milieu de fermentation, du dosage des pH interne et externe des fèves pendant la fermentation et après le séchage.

II.2.3.1. Mesure de la Température

La température du milieu de fermentation a été prise lors de la mise en fermentation et toutes les 24h pendant 5 jours d'affilé ceci suivant le protocole décrit par Binh *et al.* (2012). Elle consiste à placer successivement : thermomètre à 20 cm de profondeur au centre, et 5 cm de profondeur à deux endroits autres que le centre du fermenteur pendant ¼ minute. La moyenne des trois valeurs enregistrées est considérée comme la température du milieu de fermentation à l'aide d'un thermomètre à mercure.

II.2.3.2. Mesure du pH : pulpe, fèves fraîches et sèches

❖ pH de la pulpe

Le pH de la pulpe a été mesuré en prélevant au hasard 10 fèves de chaque échantillon du milieu. Les fèves prélevées ont été mélangé dans 10ml l'eau distillée tiède dans un bécher dans lequel a été introduit un barreau aimanté ; puis l'ensemble a été soumis à une agitation grâce à un agitateur magnétique afin d'homogénéiser le tout pendant quelques

secondes. Le pH du mélange ainsi obtenu correspond à la valeur indiquée par le pH-mètre (pH-2006 pH-meter) après introduction de son électrode dans le mélange.

❖ **pH interne des fèves fraîches et sèches**

Le pH interne des fèves a été déterminé par la méthode décrite par Niemenak *et al.* (2014) avec quelques modifications. Elle consiste à introduire 3 grammes de poudre de cacao dans 30 ml d'eau distillée préalablement chauffée. Le mélange a été homogénéisé sur agitation magnétique et laissé au repos jusqu'à refroidissement à une température comprise entre 20 et 25 °C. La valeur du pH a été mesuré comme précédemment décrit.

II.2.4. Evaluation des paramètres de qualité des fèves

II.2.4.1. Cut-test

Le Cut-test a été évalué suivant la méthode décrite par la *World cocoa foundation* avec de légères modifications apportées par Eyamo *et al.* (2016), 30 fèves ont été prélevé au hasard dans chaque échantillon, puis elles ont été coupées longitudinalement et placée sur une planche à Cut test. La couleur du cotylédon a été observée à l'œil nu grâce à la lumière du jour et classée dans l'une des quatre catégories suivantes : Brune (bien fermentée), Violette- Brune (moins bien fermentée), Violette (insuffisamment fermentée), Ardoisée (non fermentée). Par la suite le pourcentage des fèves de bonne qualité prélever quotidiennement a été calculer par la formule proposée par Hii *et al.* (2010) comme suite.

$$\text{Cut test score} = 5 * FVB + 10 * FB$$

FVB : Nombre de Fèves Violette-Brunes

FB : Nombre de Fèves Brunes

II.2.4.2. Préparation des fèves

Le dosage des composés biochimiques a été réalisé sur la poudre fine de cacao obtenue des cotylédons des fèves débarrassées des téguments et broyés à dans un robot mixeur de marque Mr. Magic (Model 3186-1). La poudre obtenue a été délipidée suivant le protocole de **Dai, 2017**. A cet effet, trois (03) g de poudre de cacao ont été mélangé à 3 ml d'une solution d'hexane puis porter à la centrifugation à 4°C pendant 10min, le surnageant constituer des graisses a été retiré et le culot obtenu a été séché.

II.2.4.3. Indice de fermentation

L'indice de fermentation a été déterminé selon la méthode décrite par Gouvierra et Tserivitinov (1979) et modifiée par Eyamo *et al.* (2016) : 0,1g de poudre de cacao délipidé a été mélangé avec 10 ml de solution de MeOH-HCl (97/3) v/v. Le mélange a été incubé à une température de 8 ± 2 °C pendant 20 Heures, la solution a été filtrée à l'aide d'un papier Wattman N° 4. Le filtrat obtenu a été utilisé pour la lecture des densités optiques au spectrophotomètre (Jenway 6305) à des longueurs d'ondes respectives de 460 nm et 530 nm. L'estimation des indices a été fait par le rapport suivant :

$$IF = \frac{DO_{460nm}}{DO_{530nm}}$$

II.2.4.4. Extraction et dosage des composés phénoliques : Polyphénols totaux et Flavonoïdes

L'extraction des composés phénoliques a été faite suivant le protocole décrit par Hernández-Hernández *et al.* (2018) . Pour cela, 100 mg de poudre de cacao délipidé ont été mélangé dans 5ml du solvant d'extraction (méthanol), l'ensemble a été agité à l'aide d'un barreau aimanté pendant 15 min. Le mélange obtenu a été centrifugé pendant 10 min à 4°C à une vitesse de 3500rpm. Le surnageant qui constitue l'extrait brute de polyphénols a été récupéré dans les tubes à Eppendorf et conservé à -20°C.

Le dosage des phénoliques totaux quant à lui s'est fait par la méthode décrite par Singleton *et al.* (1999) : selon cette méthode, en présence d'un échantillon contenant des composés phénoliques, le réactif de Folin-Ciocalteu (mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolibdique) de couleur jaune est réduit en un mélange d'oxyde de tungstène et de molybdène de couleur bleu en milieu alcalin et dont l'intensité de la couleur est proportionnelle à la teneur en composés phénoliques présents dans l'échantillon de départ. Pour cela, 25µl de chaque surnageant phénoliques (polyphénols et flavonoïdes) a été dilué au 1/10 puis mélangé avec 3,5 ml d'eau distillé. Un volume de 0,5 ml de Folin-Ciocalteu a été ajouté au mélange et le tout a été porté à une agitation afin de rendre l'ensemble homogène, ensuite 1ml de solution de carbonate de sodium à 20 % (m/v) a été ajouté au mélange précédent et porté à incubation à 40°C pendant 15 minutes temps au bout duquel on observe une coloration bleue dont l'absorbance est lue au spectrophotomètre à une longueur d'ondes de 760 nm. La teneur

en flavonoïdes est déduite de la différence entre les polyphénols totaux obtenus de l'extrait brute de polyphénols et les polyphénols obtenus de l'extrait non flavonoïdes ; selon la formule :

$$[\text{Flavonoïdes}] = [\text{polyphénols totaux}] - [\text{extrait non flavonoïdes}]$$

Les teneurs de polyphénols et de flavonoïdes sont exprimées en mg d'EAG/g de poudre de cacao délipidée

II.2.4.5. Dosage des anthocyanines

Le dosage des anthocyanines repose sur leurs propriétés à changer de couleur en fonction du pH. Cette variation de pH n'affectant pas la fonction phénolique, empêche alors toutes les interférences au cours du dosage et l'absorbance mesurer est celle des anthocyanines. La méthode utilisée est celle décrite par Guisti et Wrolstad (2001). Un système de deux tampons a été utilisé, il s'agit du chlorure de potassium à 0,025M (pH1 = 1) et l'acétate de sodium à 0,4M (pH2 =4,5). 0,4ml d'extrait est mélangé avec 3,6 ml de chaque solution tampon, les absorbances ont été lues à 510 et à 700nm. L'absorbance qui correspond aux anthocyanines est calculé comme suit : $A = (A_{510} - A_{700}) \cdot \text{pH } 1 - (A_{510} - A_{700}) \cdot \text{pH } 2$. La concentration en anthocyanines a été exprimée en mg équivalent de cyanidine-3-glycoside par gramme de poudre de cacao délipidé, et calculée selon l'équation suivante :

$$[\text{Anthocyanine}] = \frac{A * MM}{AM} \text{ avec :}$$

A : Absorbance

MM : masse molaire de la cyanidine-3- glycoside (449,2 g/mol)

AM : coefficient d'absorbance molaire (26900 mol.cm. L).

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. RESULTATS

III.1.1. Effet de la durée du *Beans spreading* sur l'évolution des levures et des bactéries au cours de la fermentation

Le suivi de la flore fongique et bactériennes en fonction du temps de fermentation à différentes durées de *Beans spreading*, est présentée dans la figure 6 exprimées en log UFC/g. Dans cette partie, les résultats obtenus du dénombrement des bactéries lactiques non pas été inclus à cause de leur évolution différente par rapport aux autres flores par conséquent ces résultats ont été introduit dans l'annexe (Annexe 1). Ces résultats montrent une évolution similaire dans les deux sites avec quelques différences en fonction de la durée du *Beans spreading* par conséquent seuls les résultats du site de Bibe ont été reportés dans cette partie et ceux de Nkometou dans l'annexe (Annexe 2). De façon générale, les charges des levures sont comprises entre 5,18 log UFC/g du traitement témoin lors de la mise en fermentation et 8,74 log UFC/g à 18H du *Beans spreading* après 24H de fermentation (Figure 6 .A) et celle des bactéries acétiques entre 6,23 log UFC/g du traitement témoin lors de la mise en fermentation et 8,41 log UFC/g à T18H du *Beans spreading* après 48H de fermentation (Figure 6 .B).

➤ Flore fongique (levures)

Avant la mise en fermentation la concentration en levures dans les traitements T12H et T18H est largement supérieure à celle du traitement T0H (témoin) et T6H. Cette différence est de l'ordre de +2,63 log (7,81 log UFC/ml contre 5,1 log UFC/g) et +2,62 log (7,8 log UFC/g contre 5,1 log UFC/g) respectivement pour les traitements T12H et T18H. Les traitements T0H et T6H ont une évolution similaire avec une croissance exponentielle durant les premières 24 heures où le pic est observé. Le taux de croissance de ces traitements après 24 heures de fermentation est de + 3,01 log (8,18 log UFC/ml contre 5,1 log UFC/g) et + 2,37 log (8,35 log UFC/g contre +5,98 log UFC/g) pour T0HJ1 et T6HJ1 respectivement. Du jour 1 jusqu'à la fin de la fermentation, la charge en levure varie faiblement dans ces deux traitements. Les traitements T12H et T18H quant à eux sont marqués par une faible évolution de la quantité des levures avec des pics qui apparaissent au cours des premières 24 heures de fermentation également et présentent un taux de croissance de +0,75 log (8,56 log UFC/g contre 7,80 log UFC/g) et de +0,93 log (8,73 log UFC/g contre 7,80 log UFC/g) respectivement, et varie peu jusqu'à la fin de la fermentation (Figure 6. A).

➤ Flore Bactérienne (bactéries acétiques)

Les traitements T12H et T18H présentent des charges plus élevées en bactéries acétiques par rapport aux traitement T0H et T6H dès la mise en fermentation tout comme la variation des levures. La variation de charge initiale des bactéries entre ces traitements et le traitement T0H est de + 0,79 log (log 7,01 log UFC/g contre 6,22 log UFC/g) et +0,99 log (7,21 log UFC/g contre 6,22 log UFC/g) respectivement T12H, T18H. tout au long de la fermentation, les traitements T0H et T12H ont une évolution similaire, la charge maximale est atteint au jour 2 avec un taux d'augmentation de +1,90 log et (8,12 log UFC/g contre 6,23 log UFC/g) et +1,39 log (8,40 log UFC/g contre 7,01 log UFC/g) par rapport au jour 0 respectivement pour les traitements T0H et T12H. La charge finale en bactéries acétiques de ces traitements est de l'ordre de 7,51 log UFC/g et 8,38 log UFC/g respectivement. Les traitements T18H et T6H quant à eux ont chacun une évolution particulière, le traitement T18H évolue en dent de Cie avec une croissance maximale de 8,07 log UFC/g au jour 3 contre 7,21 log UFC/g du jour 0 soit un taux d'augmentation de +0,86 log . Le traitement T6H par contre augmente légèrement au cours de la fermentation avec un taux d'augmentation de +0,96 log au jour 1 (7,18 log UFC/g contre 6,22 log UFC/g), la charge finale en fin de fermentation est de 7,52 log UFC/g (Figure 6. B).

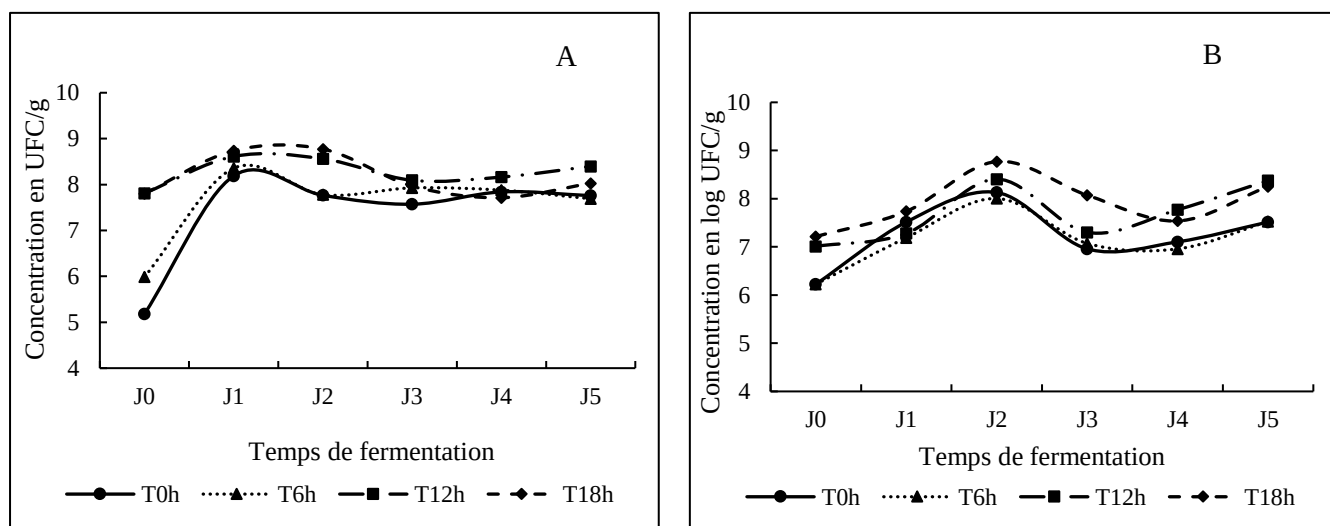


Figure 6. Evolution des flores microbiennes au cours de la fermentation en fonction du temps de fermentation A : levures ; B : bactéries acétiques

III.1.2. Effet de la durée du *Beans spreading* sur les paramètres physico-chimiques et de qualités du milieu de fermentation et de la fève

III.1.2.1 Effet de la durée du *Beans spreading* sur les paramètres physico-chimiques

Les résultats obtenus sur la variation de la température et du pH du milieu de fermentation sont présentés dans la figure 7 ci-dessous avec la température exprimée en °C

La variation de la température en fonction de la durée de fermentation, montre une cinétique ayant l'allure d'une cloche quel que soit le site de fermentation. Cette cloche se caractérise par un pic d'environ 42°C et dont l'apparition dépend de la durée du prétraitement (*Beans spreading*). Ainsi pour les durées de *Beans spreadings* de 0 et 6 heures, le pic de température apparaît après 72 heures de fermentation alors que pour des prétraitements de 12 et 18 heures, c'est 24 heures après le début de fermentation que ce pic est obtenu qui, va décroître jusqu'à 30°C en fin de fermentation (120 heures). La variation du pH dans les fèves de cacao qui montre une allure d'une hyperbole renversée, indique que le pH diminue dans la fève. Cette variation de pH montre que pour les durées de *Beans spreadings* de 0 heure et 6 heures, le pH de la fève atteint sa valeur minimale autour de 5.3 et 4,7 après 48 heures de fermentation respectivement à Bibé et à Nkometou. Tandis que pour les durées de *Beans spreadings* de 12 heures et de 18 heure, c'est après 24 heures de fermentation que l'on atteint cette valeur minimale de 5,5 environ quelques soit le site d'étude et qui au demeurant ne change plus jusqu'à 120 heures de fermentation indépendamment du site où s'est déroulé la fermentation.

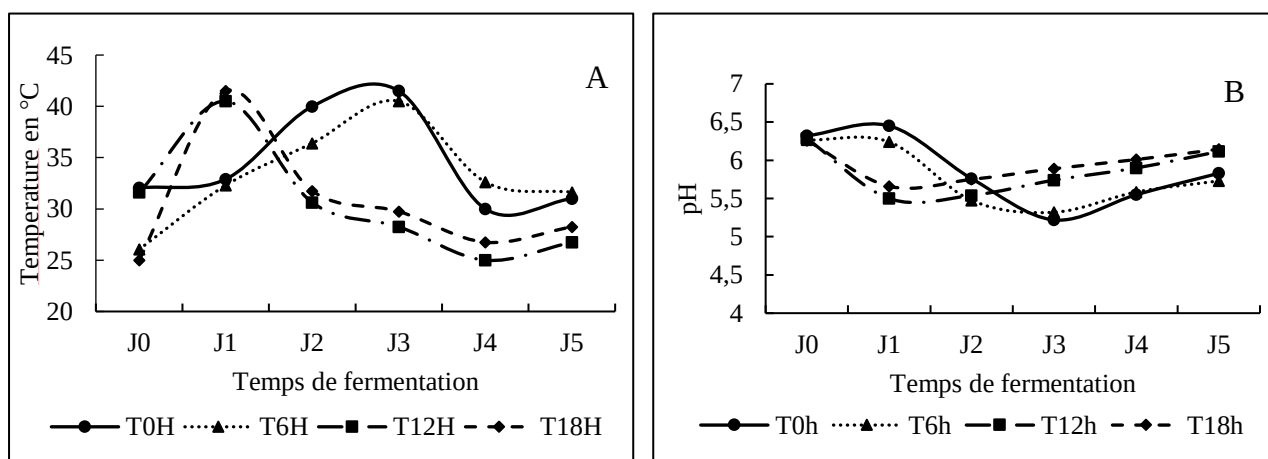


Figure 7. Evolution des paramètres physico-chimiques au cours de la fermentation en fonction du temps de fermentation A : la température ; B : pH

III.1.2.2 1 Effet de la durée du *Beans spreading* sur les paramètres de qualité des fèves

➤ Effet du traitement sur la coloration interne de la fève (Cut-test)

L'épreuve à la coupe nous a permis d'évaluer la variation de la couleur des cotylédons ceci par coupure longitudinale des fèves et observation à la lumière du soleil. La coloration des fèves varie au cours de la fermentation et diffère d'un traitement à un autre et d'un site à un autre tout au long du processus. Dans un site comme dans l'autre la couleur varie entre la couleur ardoisée et le brun ceci passant par les couleurs ardoisé-violet, violet, violet-brun (Figure 8).

Au site de Bibe les coupes des fèves des traitements T0H et T6H ont des couleurs journalières proche. Du jour 1 au jour 2 les fèves ont une coloration ardoisée à 95%. Au jour 2 les fèves de ces deux traitements sont violettes à 75%, au jour 3 le violet-brun est la couleur dominante à 60%, par contre au jour 5 les fèves de T0H et T6H sont presque totalement brunes à 99% environ. Les traitements T12H et T18H présentent une similarité en termes de coloration interne des fèves. Du jour 1 au jour 2 les fèves sont violettes à 70%, du jour 3 au jour 6 les fèves sont pratiquement toutes brunes à 98% (Figure 8. A). Cette variation de la couleur interne des fèves dans était quasiment similaire pour tous les traitements dans le site de Nkometou.

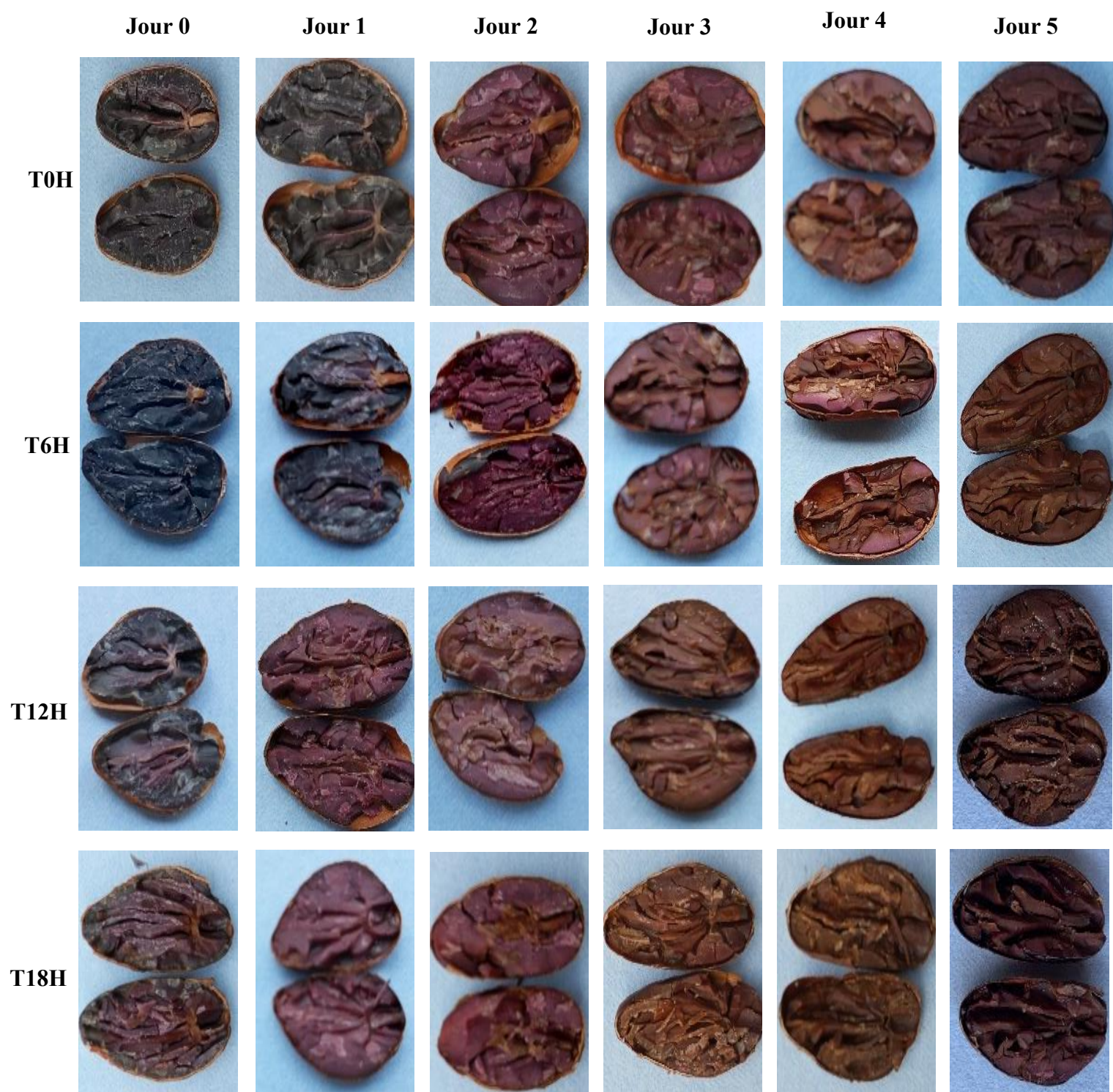


Figure 8. Evolution de la coloration interne des fèves au cours de la fermentation en fonction du temps de fermentation par traitement

❖ Cut-test score

Le Cut-test score réalisé montre de façon générale que les 2 premiers jours (jour 0 et jour 1) la quasi-totalité des fèves sont ardoisée. Les fèves brunes représentent sensiblement 2/1000, dès le jour 2 de la fermentation la quantité de fèves brunes augmente pratiquement à 500/1000 et près de 900/1000 après le jour 2 de fermentation pour les traitements 12h et 18h. Les traitements T0H, T6H par contre présentent les proportions moins élevées jusqu'au troisième jour de fermentation et un nombre de fèves brunes d'environ 900 sur 1000 fèves au cinquième jour de fermentation.

Tableau III : Nombre des fèves brunes dans 1000 fèves (Site de Bibe)

Site	Traitements	J0	J1	J2	J3	J4	J5
BIBE	T0H	0	0	15	500	750	925
	T6H	0	05	15	450	725	925
	T12H	0	325	525	850	870	950
	T18H	25	475	600	875	900	975

III.1.2.2. Indice de fermentation

Les résultats obtenus dans cette analyse montrent que les indices de fermentation varient en fonction du site d'étude (Figure 9).

Au site de Bibe, on observe une augmentation de l'indice de fermentation avec des valeurs comprises entre 0,30 (T6hJ0) et 1,15 (T6hJ5). Bien que ces indices de fermentations augmentent au cours de la fermentation, seules les fèves des traitements T0h et T6H atteignent la valeur de 1 dès le jour 3 pour le T0H et le jour 5 pour le T6h. Les traitements T12h et T18h atteignent leurs valeurs maximales de 0,97 et de 0,84 au jour 5.

Pour les fèves de Nkometou, les indices de fermentation vont de 0,51 (T0HJ0) à 1,13 (T12hJ5). L'ensemble des fèves ont présentés des indices de fermentation supérieure à 1 au jour 5 soit 1,04 ; 1,01 ; 1,13 et 1,04 pour les traitements T0h, T6h, T12h et T18H, avec le traitement T18H qui présente un indice de 1,03 dès le jour 3.

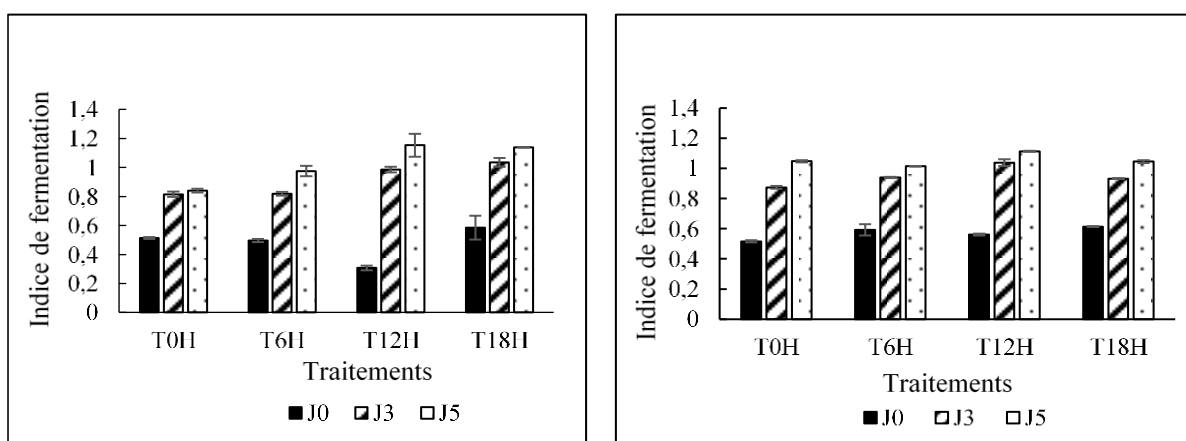


Figure 9. Evolution des indices de fermentation au cours de la fermentation en fonction du temps de fermentation Bibe A et Nkometou B

III.1.2.3. Polyphénols Totaux

Les teneurs en composés phénoliques sont exprimées en mg EAG/g pcd (milli gramme équivalent d'acide gallique par g de poudre de cacao delipidé). Les résultats obtenus sur la teneur des polyphénols totaux montrent une réduction de ces derniers avec la durée de fermentation qui diffère entre les traitements d'un site à un autre. (Figure 10).

Au site de Bibe, Les teneurs sont comprises entre 48,5 mg EAG/g pcd (T18H jour 5) et 125,91 mg EAG/g pcd (T0H jour 0). La figure présente on observe une réduction progressive du jour 0 au jour 5 pour les quatre traitements sans exception. L'ensemble des traitements présentent des niveaux de dégradation différent entre le début de la fermentation (J0) et la fin (J5) avec le traitement T18H qui enregistre la plus grande dégradation de 56,57% (soit 111,67 mg/g contre 48,5 mg EAG/g) suivi des traitements T0H, T6h et T12h pour les pourcentages de 46,6% ; 34,98 et 33,45%.(figure 10.A)

La teneur des composés phénoliques sont comprises de 74,33 mg/g (T12H jour 5) et 156,91 mg/g (T0H jour 0) au site de Nkometou. De façon générale il y a diminution au cours de la fermentation pour tous les traitements. Le traitement T0H montre une réduction de 156,91 mg EAG/g pcd du jour 0 à 100,58 mg EAG/g pcd au jour 5 soit un taux de diminution de - 35,90%. Le traitement T6H montre une réduction de 148 mg EAG/g pcd du jour 0 à 95,25 mg EAG/g pcd au jour 5 soit un taux de diminution de-35,64%. Les traitements T12H et T18H par contre présentent une forte réduction de l'ordre de -48,50% et -58,85% soit une réduction de 144,33 mg EAG/g pcd du jour 0 à 74,33 mg EAG/g pcd au jour 5 respectivement pour T12H et pour T18H. Ces deux derniers traitements montrent une réduction très élevée entre le jour 0 et le jour 3 pratiquement à-43,74% et à -24,23% respectivement (Figure 10. B).

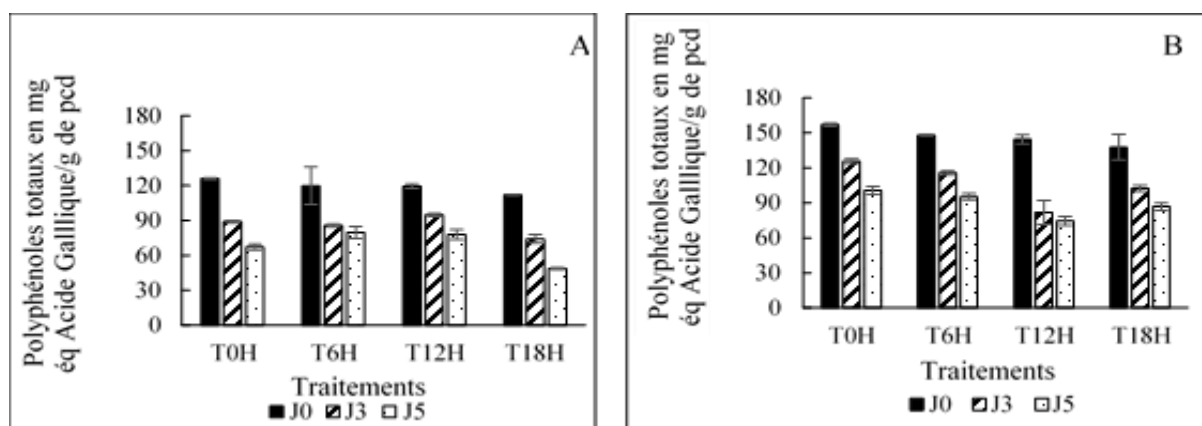


Figure 10. Teneur en composé phénolique au cours de la fermentation en fonction du temps de fermentation A : Bibe et B : Nkometou

III.1.2.4. Anthocyanines

Les résultats obtenus dans cette analyse montrent que la teneur en anthocyanine varie en fonction du site d'étude et des traitements. Cette teneur est exprimée en mg EAG/g pcd (mg équivalent d'acide gallique par g de poudre de cacao delipidé) (Figure 11).

La teneur en anthocyanines pour le site de BIBE est comprise entre 0,38 mg EAG/g pcd (T6H jour 5) et 3,62 mg EAG/g pcd (T0H jour 0). Cette réduction est progressive du jour 0 au jour 5 pour les tous les traitements exception. Cette réduction est plus forte pour le traitement T6H de -88,39% soit une réduction de 3,34 mg EAG/g pcd à 0,38 mg EAG/g pcd. Le taux de diminution pour l'autre traitement est de -84,91% ; soit une réduction de 6,62 mg/g du jour 0 à 0,54 mg EAG/g pcd au jour 5 pour le traitement. Le traitement T12H quant à lui présente une réduction de 3,33 mg EAG/g pcd du jour 0 à 0,49 mg EAG/g pcd soit un taux de diminution de -85,13%. En fin le traitement T18H présente une réduction de 3,21 mg EAG/g pcd du jour 0 à 0,75 mg EAG/g pcd soit un taux de diminution de -76,36% (Figure 11. A).

La teneur en anthocyanine est comprise de 0,05 mg/g (T6H jour 5) et 2,81 mg EAG/g pcd (T0H jour 0) au site B. De la même façon qu'au site de BIBE la teneur en anthocyanines diminue continuellement au cours de la fermentation pour tous les traitements. Le traitement T6H montre une réduction de 2,12 mg EAG/g pcd du jour 0 à 0,05 mg EAG/g pcd au jour 5 soit un taux de diminution de -97,24%. Le traitement T0H montre une réduction de 2,81 mg EAG/g pcd du jour 0 à 0,43 mg EAG/g pcd au jour 5 soit un taux de diminution de. Le traitement T12H à son tour montre une réduction de 2,09 mg EAG/g pcd du jour 0 à 0,53 mg EAG/g pcd au jour 5 soit un taux de diminution de -74,30%. En fin le traitement T18H montre une réduction de 2,38 mg EAG/g pcd du jour 0 à 0,32 mg EAG/g pcd au jour 5 soit un taux de diminution de -86,34% (Figure 11. B)

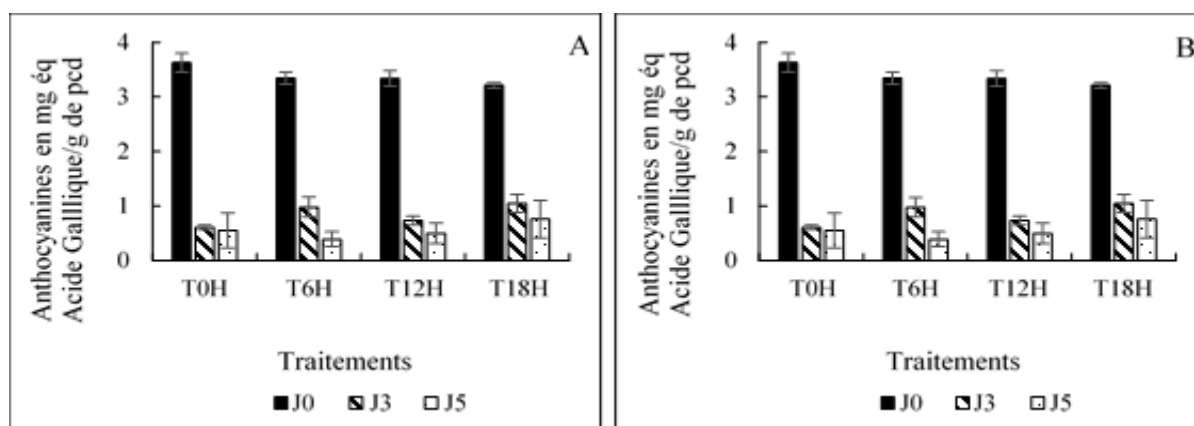


Figure 11. Teneur en anthocyanines dans les fèves en fonction du temps de fermentation: Bibe (A) et Nkometou (B)

III.1.3. Corrélations entre les paramètres biochimiques et la dynamique microbienne

L'analyse en composante principale fait dans les deux sites de travail a permis de montrer la corrélation entre les différents paramètres biochimiques (polyphénols totaux et anthocyanines) ; la dynamique microbienne ; les traitements et le temps de fermentation (Figure 12).

La figure 12.A présente la corrélation entre les variables analysées au site de BIBE et permet d'expliquer 91,24% de différences observées entre les variables réparties sur deux axes (F1 et F2). L'axe F1 permet d'expliquer à lui seul 78,50% de l'inertie totale et est principalement constitué dans sa partie positive par les polyphénols totaux, les anthocyanines et pH, caractéristiques liées aux échantillons du jour 0 de la fermentation (T0H, T6H, T12H et T18H). Sa partie négative est expliquée par les flores de levures et acétiques ainsi que de l'indice de fermentation lesquels sont associés aux échantillons de trois jours de fermentation ayant été prétraités (*Beans spreading*) pendant 12 et 18 heures ainsi que tous les échantillons de 5 jours fermentation quel que soit leur durée du *Beans spreadings*. L'axe F2 (12,74%) explique peu de différence entre les variables étudiées.

Les corrélations entre les variables analysées dans les échantillons de fèves de cacao provenant du site de Nkometou sont présentées par la figure 12.B. il ressort de cette dernière que la différence entre les variables est expliquée à 88,63% avec L'axe F1 expliquant majoritairement (76,59%) ces différences. F1 dans sa partie positive est principalement expliquée par l'indice de fermentation, la flore acétique, variables reliées à tous les traitements ayant subi 5 jours de fermentation et à ceux ayant subi 3 jours de fermentation pour les durées de *Beans spreading* de 12 heures et 18 heures. La partie négative cet axe est expliquée par la

forte teneur en anthocyanines, en polyphénols et pH qui liés aux échantillons n'ayant pas subi une fermentation quelques soit la durée du Beans spreadings. L'axe F2 par contre explique juste 8,87% de différence. Sa partie positive est expliquée par la flore fongique relié aux échantillons de trois jours de fermentation des traitements T0H et T6H (Figure 12. B).

Ces résultats, aussi bien à Bibe qu'à Nkometou, mettent en opposition les fèves de cacao de qualité médiocre (n'ayant pas été bien fermentées) caractérisées par des faibles teneurs en microorganismes, une forte teneur en polyphénols totaux et anthocyanines et un indice de fermentation en dessous du seuil de qualité ; et les fèves de cacao de bonne qualité (de 3 et 5 jours de fermentation) qui se caractérisent par une faible teneur en polyphénols totaux, anthocyanines les flavonoïdes. Toutefois il est à relever que la flore fongique du site de Nkometou a montré une dynamique différente de celle de Bibe.

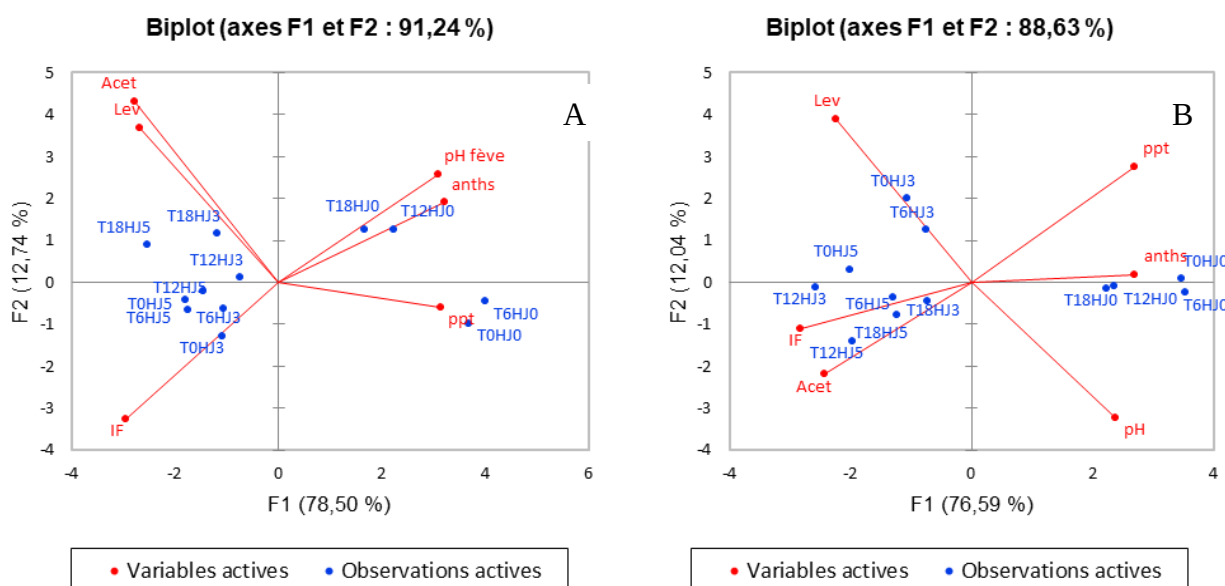


Figure 12. Corrélations multivariées entre les variables ; A : Bibe et B : Nkometou. IF= Indice de Fermentation ; Lev= Levures ; Acet= Bactéries acétique ; ppt= polyphénols totaux ; anths= anthocyanines

III.2. DISCUSSION

L'amélioration de la qualité de la fève de cacao pour la satisfaction des industries de transformation est enjeu primordial. La recherche sans cesse des méthodes et stratégies plus efficaces demeure une préoccupation majeure. La modification de la pulpe de cacao par le *beans spreading* comme technique de fermentation pourrait être une solution.

Les résultats obtenus sur l'évolution des levures et bactéries acétiques au cours de la fermentation après application du *beans spreading* montrent que les traitements 12h et 18h ont un effet significatif sur ces flores. Ceci est visible par leurs charges initiales lors de la mise en fermentation. Les levures présentent un décalage d'environ 3 log (8 log UFC/g contre 5 log UFC/g pour le site de Bibe) et 1 log (7 log UFC/g contre 6 log UFC/g pour le site de Nkometou) de plus par rapport au traitement témoin (0h de *Beans spreading*). Ces différences pourraient être dû d'une part à une contamination supplémentaire lors de l'étalage, car l'une des principales sources de contamination des fèves pour la fermentation est liée aux manutentions et ustensiles utilisées (Koffi *et al.*, 2013 ; Medjahdi Khadidj, 2020). D'autre part la diminution de la quantité d'eau, de sucres, de l'acide citrique et une oxygénation du milieu durant 12 à 18h d'exposition pourrait favoriser la multiplication rapide des levures. Les travaux de Rahardjo *et al.* (2022) ont montré que la diminution du substrat (sucre et acide citrique) accélère l'activité métabolique (moins le substrat est en quantité plus les microorganismes le consomment rapidement), cette diminution de la pulpe pourrait également réduire leur phase de latence (phase au cours de laquelle elles s'adaptent au milieu) ce qui explique leur faible variation au cours de la fermentation jusqu'au cinquième jour après la phase exponentielle soit 24h pour site de Bibe et aussi en milieu aérobie les levures utilisent la voie respiratoire et se multiplient rapidement, tel qu'ont montré les travaux de Pereira *et al.* (2012) de même que ceux de Ho *et al.* (2014) ; soit 48h pour le site de Nkometou, ce décalage pourrait être dû soit aux conditions climatiques entre les deux sites. Selon les travaux de de Pereira *et al.* (2013) les dispositions géographiques et la quantité de fèves peuvent influencer la croissance microbienne au cours de la fermentation.

La croissance des bactéries acétiques est similaire quel que soit le site, lors de la mise en fermentation les traitements 12h et 18h ont des charges élevées par rapport au traitement témoin tout comme les levures. La différence d'une unité logarithmique observée pourrait être dû aux mêmes causes évoquées au paragraphe précédent concernant l'influence du *Beans spreading* sur la croissance des levures donc une contamination supplémentaire, une oxygénation et une réduction de la phase de latence par la diminution de la pulpe d'autant plus

que les levures réduisent la quantité d'acide citrique du milieu (Lagune Galvez *et al.*, 2007 ; Michel Barel, 2009). Cependant l'obtention bactéries acétiques dans cette étude en charge élevée lors de la mise en fermentation pourrait paraître étrange, selon la plupart des travaux menés sur la succession microbienne entre autres ceux de Romero *et al.* (2011) et de De Vuyst et Weckx (2016) les bactéries acétiques interviennent massivement à partir du troisième jour de fermentation. Dans cette étude l'apparition des bactéries en quantité durant les premières heures pourrait s'expliquer par l'apport en oxygène par l'air au cours l'exposition, car elles transforment l'alcool en acide acétique en présence de l'oxygène (Moens *et al.*, 2014). Selon Rahardjo *et al.* (2022) une réduction de la quantité de pulpe jusqu'à 20% accélère la fermentation en raison d'un développement plus rapide du processus de dominance microbienne.

L'oxydation de l'éthanol en acide acétique, est une réaction exothermique qui induit une augmentation de la température de la masse fermentaire (Ardhana, 2003 ; Pereira *et al.*, 2013). De façon générale aucun traitement ne franchit une température de 43°C quel que soit le site d'étude ou le traitement, contrairement aux résultats obtenus par certains chercheurs tel que Vincent et Lotodé (1970) ; Kongor *et al.*, (2016) où la température du milieu fermentaire atteint 50 °C avec des masses fermentaire allant de 100 kg à 250 kg, ceci pourrait être dû à la quantité de la masse fermentaire de 25 kg retenus dans cette étude. Dans cette étude, les traitements 12h et 18h atteignent leurs pics de température ($42 \pm 0,5$ °C) après 24h de fermentation contrairement au traitement témoin et 6h. Les travaux menés par Koffi *et al.*, (2013) et ceux de De Vuyst *et al.*, (2016) ont montré que pour une fermentation spontanée et normale le pic de température 42 ± 2 °C est situé entre 72h et 96h après de fermentation ce qui est le cas avec les résultats obtenus pour le traitement témoin et 6h de *beans spreading*. L'obtention du pic de température après 24h de fermentation pour les traitements 12h et 18h est directement lié aux différentes charges en levures et en bactéries acétique observées lors de la mise en fermentation. Les travaux menés par Pereira *et al.* (2012) ont montré que la transformation de l'alcool en acides acétique par les bactéries acétique est une réaction qui produit un dégagement de chaleur, l'activité intense de ces bactéries durant les premières 24h de fermentation est la principale cause de cette augmentation rapide de la température et la survenue précocité du pic. Les études menées par Rahardjo *et al.* (2022) ont montré qu'une réduction de la quantité de la pulpe entraîne une augmentation rapide de la température ce qui est le cas avec les résultats obtenus dans cette étude.

L'évolution du pH interne de la fève fraiches montre une chute de 6 à 5 après 24h de fermentation au site de Bibe et après 48h au site de Nkometou pour les traitements 12h et 18h contrairement au traitement témoin et 6h qui montrent plutôt cette chute après 72h de fermentation. Cette différence être directement liée à l'activité des microorganismes notamment des bactéries acétiques. La diminution du pH à l'intérieur de la fève est due à la pénétration des acides dans la fève, l'augmentation de la température du milieu de fermentation et cette diminution sont directement liées à l'activité des bactéries acétiques. Les travaux menés par Pereira *et al.* (2012) de même que ceux de Lee *et al.* (2019) ont montré que les acides produits au cours de la fermentation acétique entrent dans la fève et baissent le pH interne de la fève. La concentration initiale en bactéries acétique lors de la mise en fermentation serait la principale cause de la chute rapide du pH à l'intérieur de la fève pour les traitements 12h et 18h. La chute du pH après 24h de fermentation est une solution au problème d'acidité à l'intérieur de la fève car ce dernier se volatilise facilement ce qui est visible dans cette étude à travers l'augmentation progressive jusqu'au cinquième jour de fermentation (environ 6).

La qualité des fèves fermentées et séchées a été évaluée par la technique du Cut-test qui mesure l'index de fermentation. Cette technique se base sur la couleur comme critère d'évaluation, et est couramment utilisée pour apprécier la convenance des fèves à la fabrication du chocolat. Les fèves non fermentées ont une couleur ardoisée celle moyennement fermentée violette et celles bien fermentée sont brune (Camu *et al.*, 2008). Les résultats obtenus montrent que la couleur brune est dominante pour les fèves des traitements 12h et 18h à partir du 3^e jour contrairement au traitement témoin où la couleur brune est observée entre le 4^e et le 5^e jour. Le Cut test est le moyen le plus utilisé pour l'évaluation de la qualité du cacao car basé uniquement sur une observation visuelle de la couleur du cotylédon. Cette couleur varie en fonction de la composition biochimique de la fève, au cours de la fermentation les réactions chimiques induit par la pénétration des acides dans le cotylédon sont principalement à l'origine de ces changements, la chute rapide du pH interne de la fève entre 24h et 48h pour les traitements 12h et 18h pourrait expliquer l'obtention des fèves majoritairement brune dès le 3^e jour (72h) de fermentation. Ceci est une fois de plus justifier par les valeurs de l'indice de fermentation qui sont sensiblement égale à 1 pour ces traitements dès le troisième jour de fermentation peu importe le site d'étude. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Saunshia *et al.* en 2018 qui ont montré qu'un indice de fermentation compris entre 0,85 et 1 donne un Cut test score de 80% à 100% après séchage.

La réduction de la teneur en composés phénoliques et en anthocyanes est plus considérable et plus pour les traitements 12h et 18h. Les travaux menés par Niemenak *et al.* (2016) ont montré que les teneurs élevées en polyphénols totaux et anthocyanines dans les échantillons de fèves de cacao s'expliquent par une absence ou mauvaise fermentation des fèves de cacao résultats obtenus également par Cros *et al.*, 1995 ainsi que Camu *et al.*, 2008. En effet, les fèves de cacao non fermentées sont riches en ces composés qui, au cours de la fermentation baissent suite à l'activité microbienne et enzymatique élevée pour les fèves de cacao fermentées pendant 5 jours pour tous les traitements et 3 jours (119 mg EAG/g Pdc à 75 mg EAG/g Pdc et 140 mg EAG/g Pdc à 80 mg EAG/g Pdc) respectivement pour le site de Bibe et celui de Nkometou pour les traitements 12h et 18h. Selon les travaux de Villeneuve *et al.* (1994) et ceux de Afoakwa *et al.* (2013) la diminution de la teneur en polyphénols totaux et en anthocyanine est due à des phénomènes de diffusion, de tannage et de polymérisation oxydative à l'intérieur de la fève après pénétration des acides. La forte réduction de la teneur en polyphénols totaux et anthocyanines pour les traitements 12h et 18h est dû à la forte activité microbienne durant les premières 24h de fermentation (Rahardjo *et al.*, 2022).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

IV.1. CONCLUSION

L'objectif général de ce travail été d'évaluer l'influence de la durée du *Beans Spreading* sur la dynamique microbienne au cours de la fermentation et sur la qualité de la fève. Les résultats issus de l'évaluation de la dynamique microbienne ont montré une évolution différente des flores microbiennes en fonction des traitements. La succession microbienne reste la même dans tous les traitements quel que soit le site d'étude. Néanmoins la croissance de toutes les flores (fongiques et acétiques) est plus rapide et considérable pour les traitements 12 heures et 18 heures. Ceci se voit dès la mise en fermentation où ces traitements présentent des charges microbiennes plus élevées par rapport au témoin (0 heures) et le traitement 6 heures. Le Beans spreading favorise le développement des levures et bactéries acétique en réduisant leurs temps de latence.

L'analyse des paramètres physico-chimiques et de qualité a montré des différences significatives entre les différents traitements. De façon générale la température maximale obtenue est de 42,5°C. Les traitements 12 heures et 18 heures présentent leurs pics de température et chute de pH interne 24 heures plutôt que le témoin et 6 heures. Ces traitements 12 heures et 18 heures présentent des fèves de couleur brune et un indice de fermentation supérieur ou égale à 1 dès le 3^e jour contrairement au témoin. La réduction des paramètres biochimiques (composés phénoliques, anthocyanes) est plus considérable à partir du troisième jour pour ces mêmes traitements.

IV.2. PERSPECTIVES

Cette étude a permis de voir l'influence de la durée du *beans spreading* sur la succession microbienne au cours de la fermentation des fèves de cacao et son impact sur la qualité. Toutefois pour l'amélioration de ce travail nous proposons :

- Appliquer le Beans spreading dans d'autres zones de production du cacao au Cameroun pour voir si ce dernier a le même impact positif ;
- Evaluer l'influence de la durée du Beans spreading sur la dynamique des bactéries lactiques ;
- Isoler et identifier les souches microbiennes responsables de la fermentation du cacao au Cameroun.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Afoakwa, Emmanuel. Ohene Agnes ; Simpson Budu¹, Henry Mensah-Brown², Jemmy Felix Takrama³ and Evans Akomanyi¹ (2014).** Changes in Biochemical and Physico-chemical Qualities during Drying of Pulp Preconditioned and Fermented Cocoa (Theobroma cacao) Beans. *Journal of Nutritional Health & Food Science*, 2(3). <https://doi.org/10.15226/jnhfs.2014.00121>
- Anonyme 1, (2024) :** Fao stat, 2024.
- Anonyme 2, (2024):** STATISTA COCOA 2024
- Ardhana, M. (2003).** The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *International Journal of Food Microbiology*, 86(1-2), 87-99. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00081-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00081-3)
- Batista N. N., Ramos C. L., Ribeiro D. D., Pinheiro A. C. M., Schwan R. F. (2015)** LWT - Food Sci. Technol. 63, 221
- Biehl B, Meyer B, Said, Samarakoddy, RJ (1989)** Postharvest pod storage a method for pulp preconditioning to impair strong nib acidification during cocoa fermentation in Malaysia. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 48(3): 285-304.
- Camu, N., De Winter, T., Addo, S. K., Takrama, J. S., Bernaert, H., & De Vuyst, L. (2008).** Fermentation of cocoa beans: Influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate: Heap fermentation versus chocolate production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(13), 2288-2297. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3349>
- Cros E., Jeanjean N. (1995).** Qualité du cacao influence de la fermentation et du séchage
- De Melo Pereira, G. V., Magalhães, K. T., De Almeida, E. G., Da Silva Coelho, I., & Schwan, R. F. (2013).** Spontaneous cocoa bean fermentation carried out in a novel-design stainless steel tank: Influence on the dynamics of microbial populations and physical–chemical properties. *International Journal of Food Microbiology*, 161(2), 121-133. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.018>
- De Vuyst, L., & Weckx, S. (2016).** The cocoa bean fermentation process : From ecosystem analysis to starter culture development. *Journal of Applied Microbiology*, 121(1), 5-17. <https://doi.org/10.1111/jam.13045>

- Deheuvels O., (2011).** *Compromis entre productivité et biodiversité sur un gradient d'intensité de gestion de systèmes agroforestiers à base de cacaoyers de Talamanca*. Thèse, Montpellier SupAgro, 185 p.
- E. Guzmán-Alvarez, R., & G. Márquez-Ramos, J. (2021).** Fermentation of Cocoa Beans. In M. Laranjo (Éd.), *Fermentation—Processes, Benefits and Risks*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.98756>
- Essia Ngang J. J., Yadang G., Kamdem S.L.S, Kouebou C. P., Fanche S. A.Y, Kougan D. L.T, Tsoungui A., Etoa F. X. (2015).** Antifungal properties of selected lactic acid bacteria
- Eyamo, E.V.J., de Taeye, c., NiemenAk, N., Youmbi, E., Collin, S., (2016):** Influence of acetic and lactic acids on cacao flavan-3-ol degradation through fermentation-like incubations. *LWT - Food Sci. Technol.* 68, 514-522. and application in the biological control of ochratoxin a producing fungi during cocoa fermentation. *Biocontrol Sci. Technol.* 25, 245.
- Guisti M.M. & Wrolstad R. (2001).** “Anthocyanins characterization and measurement with UVvisible spectroscopy”. *Current protocols in food analytical chemistry*, 6: 103-112
- Gouvierra K. & Tserrevitinov O.B. (1979).** Method of evaluating the degree of fermentation of cocoa beans. *USSR Patent* : 12–22.
- Hernández-Hernández C., Morales-sillero A., Bermúdez-oria A. & Azpeitia A., 2018b.** Cocoa bean husk : industrial source of antioxidant phenolic extract. *Journal of Science Food and Agriculture*, (July): 1–10.
- Hii C.L., Law C.L., Cloke M. & Suzannah S., (2010).** Thin layer drying kinetics of cocoa and dried product quality. *Biosystems Engineering*, 102 (2): 153–161.
- Ho, V. T. T., Zhao, J., & Fleet, G. (2014).** Yeasts are essential for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 174, 72-87. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.014>
- Ives Bruno M. Efombagn & Juan C. Motamayor & Olivier Sounigo & Albertus B. Eskes & Salomon Nyassé & Christian Cilas & Ray Schnell & Maria J. Manzanares-Dauleux & Maria Kolesnikova-Allen (2008).** Genetic diversity and structure of farm and GenBank accessions of cacao (*Theobroma cacao* L.) in Cameroon revealed by microsatellite markers

- Kongor, J. E., Hinnah, M., De Walle, D. V., Afoakwa, E. O., Boeckx, P., & Dewettinck, K. (2016).** Factors influencing quality variation in cocoa (*Theobroma cacao*) bean flavour profile—A review. *Food Research International*, 82, 44-52. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.012>
- Kostinek, M., Ban-Koffi, L., Ottah-Atikpo, M., Teniola, D., Schillinger, U., Holzapfel, W. H., & Franz, C. M. A. P. (2008).** Diversity of Predominant Lactic Acid Bacteria Associated with Cocoa Fermentation in Nigeria. *Current Microbiology*, 56(4), 306-314. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9097-9>
- Lagunes Gálvez, S., Loiseau, G., Paredes, J. L., Barel, M., & Guiraud, J.-P. (2007).** Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. *International Journal of Food Microbiology*, 114(1), 124-130. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.041>
- L. BAN KOFFI, G. H. OUATTARA, T. G. KAROU, S. TAGRO GUEHI, J. G. NEMLIN et J. K. DIOPHO (2013).** Impacts de la fermentation du cacao sur la croissance de la flore microbienne et la qualité des fèves marchandes. Université Félix Houphouët Boigny, UFR Biosciences, 22 BP 582 Abidjan 22, Côte d'Ivoire. 3Université Nangui Abrogoua, UFR Sciences et Technologies des Aliments
- Lee, A. H., Neilson, A. P., O'Keefe, S. F., Ogejo, J. A., Huang, H., Ponder, M., Chu, H. S. S., Jin, Q., Pilot, G., & Stewart, A. C. (2019).** A laboratory-scale model cocoa fermentation using dried, unfermented beans and artificial pulp can simulate the microbial and chemical changes of on-farm cocoa fermentation. *European Food Research and Technology*, 245(2), 511-519. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3171-8>
- Lefeber T, Janssens M, Moens F, Gobert W, De Vuyst L. (2011).** Interesting starter culture strains for controlled cocoa bean fermentation revealed by simulated cocoa pulp fermentations of cocoa-specific lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:6694 – 6698.
- Medjahdi Khadidj (2020)** Paramètres de croissance des microorganismes dans les aliments
- Michel Barel (2013).** Qualité du cacao L'impact du traitement post-récolte
- Moens, F., Lefeber, T., & De Vuyst, L. (2014).** Oxidation of Metabolites Highlights the Microbial Interactions and Role of *Acetobacter pasteurianus* during Cocoa Bean Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(6), 1848-1857. <https://doi.org/10.1128/AEM.03344-13>

- Motamayor J.C., Lachenaud P., Wallace J., Loor R., Kuhn D.N., Brown S. & Schnell R.J., (2008).** Geographic and Genetic Population Differentiation of the Amazonian Chocolate Tree (*Theobroma cacao* L). *PLoS ONE*, 3 (10): 1-8.
- Mossu G., 1990.** Le cacaoyer. *Le technicien d'agriculture tropicale*, 14: 82 p
- Nazaruddin R, Seng LK, Hassan O, Said M (2006)** Effect of pulp preconditioning on the content of polyphenols in cocoa beans (*Theobroma cacao*) during fermentation. *Industrial Crops and Production* 24(1): 87–94.
- Niemenak, N., Eyamo Evina, V. J., Djabou Mouafi, A. S., Tchouatcheu Ngouambe, A. G., Bernhardt, C., Lieberei, R., & Bisping, B. (2021).** Assessment of the profile of free amino acids and reducing sugars of cacao beans from local Cameroonian Trinitario (SNK varieties) and Forastero (TIKO varieties) using fermentation-like incubation. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 321-329 Pages. <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2020.093.039>
- Niemenak, N., Eyamo, J. A., & Onomo, P. E. (2014).** *Physical and chemical assessment quality of cocoa beans in south and center regions of Cameroon.* Obubo, R. (s. d.). *Kokou Edoh Adabe et E. Lionelle Ngo-Samnick.*
- Pereira, G. V. D. M., Miguel, M. G. D. C. P., Ramos, C. L., & Schwan, R. F. (2012).** Microbiological and Physicochemical Characterization of Small-Scale Cocoa Fermentations and Screening of Yeast and Bacterial Strains To Develop a Defined Starter Culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(15), 5395-5405. <https://doi.org/10.1128/AEM.01144-12>
- Racine, K., Lee, A., Wiersema, B., Huang, H., Lambert, J., Stewart, A., & Neilson, A. (2019).** Development and Characterization of a Pilot-Scale Model Cocoa Fermentation System Suitable for Studying the Impact of Fermentation on Putative Bioactive Compounds and Bioactivity of Cocoa. *Foods*, 8(3), 102. <https://doi.org/10.3390/foods8030102>
- Rahardjo, Y. P., Rahardja, S., Samsudin, Saidah, Dalapati, A., Amalia, A. F., Purwaningsih, H., & Syamsu, K. (2022).** A literature review on cocoa fermentation techniques to shorten fermentation time. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 974(1), 012111. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/974/1/012111>

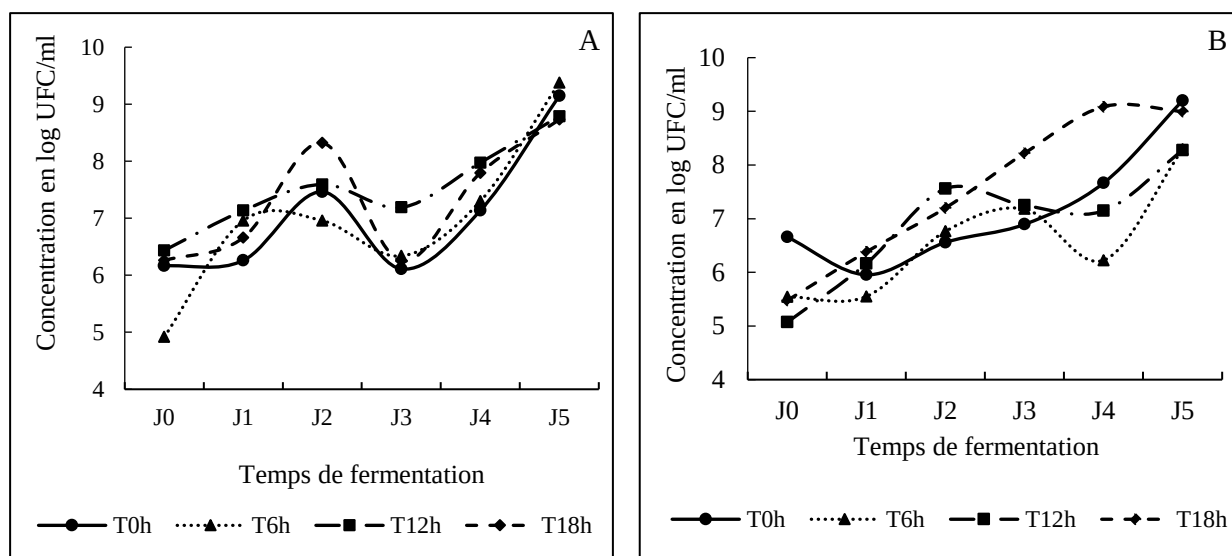
- Ramos, C. L., Dias, D. R., Miguel, M. G. D. C. P., & Schwan, R. F. (2014).** Impact of different cocoa hybrids (*Theobroma cacao* L.) and *S. cerevisiae* UFLA CA11 inoculation on microbial communities and volatile compounds of cocoa fermentation. *Food Research International*, 64, 908-918. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.08.033>
- Saunshia, Y., Sandhya, M. V. S., Lingamallu, J. M. R., Padela, J., & Murthy, P. (2018).** Improved Fermentation of Cocoa Beans with Enhanced Aroma Profiles. *Food Biotechnology*, 32(4), 257-272. <https://doi.org/10.1080/08905436.2018.1519444>
- Singleton V.L., Orthofer R. & Lamela-Raventós R.M., (1999).** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidant means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299: 152–178.
- Schwan RF, Rose, Board (1995).** Microbial fermentation of cocoa beans, with emphasis on enzymatic degradation of the pulp. *J Applied Bacteriology* 79: 96S–107.
- Stoll , L., Niemenak, N., Bisping, B., & Lieberei, R. (2017).** German cacao of Cameroon—New facts on a traditional variety fallen into oblivion. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 274-279 Pages. <https://doi.org/10.5073/JABFQ.2017.090.034>
- Tagro S. Guehi, Adjéhi T. Dadie, Kouadio P. B. Koffi, Soumaïla Dabonne, Louis Ban-Koffi, Kra D. Kedjebo (2010).** Performance of different fermentation methods and the effect of their duration on the quality of raw cocoa beans
- Tankou C.M., (2000).** *The cameroon cocoa story*. Master, Université de Dschang, 79 p.
- Thanh PB, Tru NV, Thi Thuy D, Thi Thoa N, Thao PV, Tham TT, Van Vo T (2017).** Bacteria in Wooden Box Fermentation of Cocoa in Daklak Vietnam. *Journal of Microbiol Exp*. 2017; 5: 15.
- Theodore Fred Hiag, 2 Henri Steve Olugu Voundi, 3 James Ngotom Kamen, 4 Emile Minyaka, 5 Marlyse Solange Leng, 6 Robert Ndjouenkeu (2023).** Contribution in the Improvement of Cocoa Bean Fermentation by using a Starter Microbial from Three Strains
- Vincent, J. C., & Lotodé, R. (collab). (s. d.) (1983).** *Influence de différents traitements technologiques sur la fermentation du cacao et le gout du chocolat.*
- Vitaglione P., Barone L.R., Ferracane R., Morelló J. & Reguant S.S., Miranda J., Shimoni E,F.V., (2013).** Human bioavailability of flavanols and phenolic acids from cocoa-nut

creams enriched with free or microencapsulated cocoa polyphenols. *Br. Journal. Nut*, 109: 1832–1843.

Withlock B.A., Bayer, C., Baumd (2001) Phylogenetic relationships and floral evolution of the Bettneriodeae based on sequences of the chloroplast gene. *Syst. Botany.*, 26: 420-437

ANNEXES

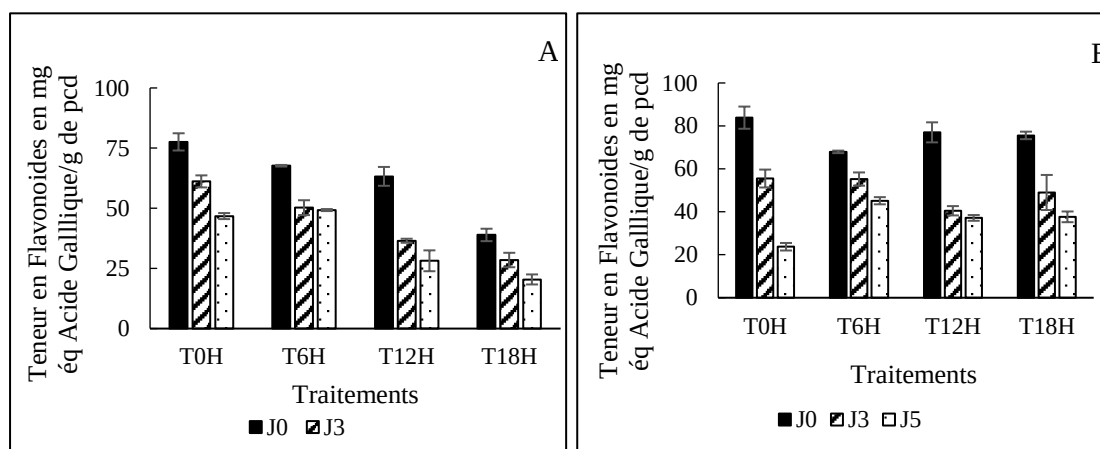
Annexe 1 : . Evolution des B. Lactiques au cours de la fermentation en fonction du temps de fermentation A : Bibe et B : Nkometou



Annexe 2 : Variation du pH des fèves sèches en fonction de la durée du *Beans spreadings* et du temps de fermentation.

	Traitements	J0	J1	J2	J3	J4	J5
Bibe	T0h	6,32 ± 0,06	6,45 ± 0,01	5,76 ± 0,01	5,22 ± 0,02	5,55 ± 0,00	5,83 ± 0,00
	T6h	6,27 ± 0,02	6,24 ± 0,01	5,48 ± 0,02	5,32 ± 0,01	5,59 ± 0,02	5,73 ± 0,01
	T12h	6,29 ± 0,08	5,50 ± 0,06	5,54 ± 0,01	5,74 ± 0,03	5,97 ± 0,01	6,14 ± 0,02
	T18h	6,26 ± 0,1	5,66 ± 0,07	5,75 ± 0,01	6,03 ± 0,01	6,07 ± 0,08	6,15 ± 0,06
Nkometou	T0H	6,28 ± 0,01	6,32 ± 0,01	5,17 ± 0,0	5,05 ± 0,0	5,25 ± 0,08	5,66 ± 0,02
	T6H	6,36 ± 0,02	6,31 ± 0,02	5,14 ± 0,0	5,04 ± 0,02	5,59 ± 0,01	5,97 ± 0,01
	T12H	6,39 ± 0,02	5,62 ± 0,02	5,69 ± 0,0	5,76 ± 0,01	5,81 ± 0,01	6,08 ± 0,03
	T18	6,22 ± 0,05	5,59 ± 0,04	5,66 ± 0,04	5,68 ± 0,01	5,89 ± 0,04	6,06 ± 0,02

Annexe 3 : Teneur en Flavonoïdes dans les fèves en fonction du temps A : Bibe et B : Nkometou



Annexe 4 : Composition des milieux de cultures pour 1L

MILIEUX	INGREDIENTS	QUANTITE (g/L)
Yeast Mannitol Agar (YMA)	Glucose	50
	Peptone	5
	Extrait de levure	3
	Extrait de malt	3
	Agar-agar	20
	Chloramphénicol	0,1
Gélose au jus de tomate	Jus de tomate (extrait sec de 0,4L)	20
	Peptone	10
	Lait peptonisé	10
	Agar-agar	14
	Fluconasol	0,1
	pH	6,1
Glucose Yeast Carbonate (GYC)	Glucose	50
	Carbonate de calcium	3
	Gélose	25
	Extrait de levure	10
	Fluconasol	0,1
	Pénicilline	0,0125

Annexe 5 : Matériel de laboratoire

Appareils

- pH-mètre (SI Analytics – Lab. 850)
- Plaque chauffante
- Autoclave
- Thermomètre
- Balance (KERN-572)
- Agitateur magnétique (Bunsen)
- Vortex mixeur (STUART SA7)
- Centrifugeuse (LABOFUGE GL)
- Spectrophotomètre (PDA-détecteur)
- Moulinex

Verreries et autres

Boîtes de Pétri	Glacière
Micro pipette	Mousseline
Sac plastique Zip	Bouteilles d'extra fresco
Béchers	Papiers filtres
Fioles jaugées	Barreaux, baguettes aimantées
Tubes à essai	Entonnoirs
Eprouvettes graduées	Mortiers, pilons
Pissettes	Pipettes
Tubes Eppendorf	Spatules
Erlenmeyers	Portoirs

Annex 6 : Courbe d'étalonnage A : Bibe ; B : Nkometou

